

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

**Importância do receptor AIM2 na diferenciação e regulação das funções
efetoras de linfócitos T_H17**

Jefferson Antônio Leite

**RIBEIRÃO PETO – SP
2022**

Jefferson Antônio Leite

Importância do receptor AIM2 na diferenciação e regulação das funções efetoras de
linfócitos T_H17

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como
parte das exigências para obtenção do título de Doutor
em Ciências – Área: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Daniela Carlos

Ribeirão Preto/SP

2022

Autorizo a divulgação parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa desde que citada a fonte

FICHA CATALOGRÁFICA

Leite, Jefferson Antônio
Importância do receptor AIM2 na diferenciação e regulação das funções efectoras de Linfócitos TH17.

Ribeirão Preto, 2022, 115p.; 1l; 30cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Câmara, Niels Olsen Saraiva

1. AIM2, Linfócitos Th17, Inflamação intestinal.

Nome: Jefferson Antônio Leite

Título: Importância do receptor AIM2 na diferenciação e regulação das funções efectoras de linfócitos T_H17

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências – Área: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em: ___/___/___

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico esta tese à
minha mãe Luzia por todo o apoio incondicional
durante todos esses anos. Muito obrigado minha
mãezinha por sempre acreditar nos meus sonhos.

Agradecimientos

Agradeço à Deus pela presença constante em minha vida e por sua grandeza e perfeição. Ao meu amigo Jesus seu filho, pela graça e bondade, pela mansidão de coração, pelo exemplo a ser seguido. À nossa mãe Maria, por sua proteção e intercessão, e que sempre mostrou o melhor caminho a seguir.

Aos meus pais Luzia e Arildo, pelo amor, carinho, cuidado e pela fundamental educação que me proporcionaram. Agradeço meu irmão João Vítor, minha cunhada Jéssica, meu sobrinho João Miguel, minha avó Inês, minha tia Rose (mãe Rosa) e minha prima Cidinha, pelo amor e por todas orações.

Aos meus amigos “peludos” Marley e Fantinha, que acredito serem os espíritos mais puros desse universo e que sempre me ensinaram o verdadeiro significado do amor. Obrigado por serem os meus guias espirituais nessa jornada e os melhores “cãozinhos” desse mundo!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara por ter me recebido em seu grupo, compartilhado seus conhecimentos que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e para o meu amadurecimento profissional. Obrigado por todo o apoio, amizade e compreensão em todos os momentos bons e ruins que transcenderam esses quatro anos. Tenho-o como um exemplo de ser humano e profissional!

À minha co-orientadora, Prof. Dr^a. Daniela Carlos, por ter me recebido em seu grupo, ter compartilhado seus conhecimentos que me contribuíram para o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. João Santana Silva, por ter me recebido em seu laboratório. Obrigado por todos os ensinamentos e oportunidades.

Ao Prof. Dr. Ari Waisman, por ter me recebido em seu laboratório, apoiado o desenvolvimento do meu projeto e contribuído com ótimas discussões e sugestões. Aos colegas do Waisman Lab, Valeriya, Carsten e Anna que colaboraram diretamente no desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas amigas Tamara e Isabel, por toda a amizade, carinho e apoio. Obrigado por estarem ao meu lado em todos esses anos e principalmente nos momentos mais difíceis.

À todos os amigos e colegas do Laboratório de Imunobiologia de Transplantes, Luísa, Luís, Eloisa, Bruno, Hedden, Marcela, Raquel, Juliana, Camila, Laís, Magaiver, Paulo, Vítor(s) e Araceli; aos amigos e colegas do Laboratório de Imunoregulação de Doenças Metabólicas, Jeff, Jhefferson, Ítalo e do laboratório de Imunoparasitologia,

Maria Cláudia, Gabriela Pessenda, Alynne, Herculano. Obrigado pelo companheirismo e apoio durante todos esses anos.

Aos funcionários da FMRP/USP e ICB/USP, Wander (Wanderzito), Vera (Verinha), Cristiane Milanezi, Denize Ferraz, Elizabete Rosa, Wendy, Rubilan, Meire e Marlise. Obrigado pela eficiência e carinho com que conduzem seus trabalhos e que possibilita a realização das nossas atividades no dia-a-dia.

A secretária do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Ana Cristine, obrigado pelo acolhimento, dedicação e zelo ao nosso programa.

A todos os camundongos utilizados nesse estudo, que através de suas vidas tornaram possível o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos membros da banca examinadora desse trabalho. Obrigado por todas as contribuições e sugestões que certamente vão contribuir para enriquecimento deste estudo.

A CAPES, pela bolsa concedida no Brasil e no exterior, que permitiram a minha dedicação integral no desenvolvimento deste estudo.

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Imunobiologia de Transplantes coordenado pelo Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara; no Laboratório de Imunoregulação de Doenças Metabólicas, coordenado pela Prof. Dr^a. Daniela Carlos; e no Instituto de Medicina Molecular da Universidade Johannes Gutenberg de Mainz, coordenado pelo Prof. Dr. Ari Waisman.

Suporte financeiro: FAPESP – Apoio a Jovens Pesquisadores: 18/14815-0; Auxílio temático: 17/05264-7, bolsa CAPES/PROEX: 88882.328430/2019-01 e bolsa CAPES Print/2021: 88887.575660/2020. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”. “This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001”

*Tudo tem o seu tempo determinado,
e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.
Há tempo de nascer, e tempo de morrer;
Tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;
Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;
Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;
Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras;
Tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;
Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;
Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;
Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.
Tenho visto o fardo que Deus impôs aos homens. Ele fez tudo apropriado ao seu
tempo!*

Eclesiastes 3:1-11

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Expressão de AIM2 em linfócitos Th17

Figura 2 – Expressão de AIM2 em linfócitos Th17 convencionais e patogênicos

Figura 3 – Expressão de AIM2 em Linfócitos IL-17A⁺ e IFN- γ ⁺ na mucosa intestinal

Figura 4 – Expressão de AIM2 em Linfócitos Th17, Th1, Th2 e Treg na mucosa intestinal

Figura 5 – Importância de TGF- β e IL-6 na expressão de AIM2 em Linfócitos Th17

Figura 6 – Análise *in silico* de ATAC-seq e ChIP-seq de H3K4me3 em linfócitos Th0 e Th17

Figura 7 – Análise *in silico* de ChIP-seq de IRF4, STAT3, BATF, MAF, p-300 em linfócitos Th0 e Th17

Figura 8 – Diferenciação *in vitro* de Linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}

Figura 9 – Proliferação e viabilidade de Linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}

Figura 10 – Diferenciação *in vitro* de Linfócitos Th1, Th2 e Treg WT e AIM2^{-/-}

Figura 11 – Produção de IL-17A *in vivo* por Linfócitos CD4⁺ WT e AIM2^{-/-}

Figura 12 – Produção de IL-17A *ex vivo* por Linfócitos T CD4⁺ efetores (CD4⁺CD25⁺CD44^{high}) WT e AIM2^{-/-}

Figura 13 – Colite induzida por transferência de Linfócitos CD4⁺ WT e AIM2^{-/-} em camundongos Rag1^{-/-}

Figura 14 – Estratégia de *gate* para análise de populações de linfócitos T CD4⁺ em amostras de linfonodos mesentérico e lâmina própria

Figura 15 – Frequência de Linfócitos Th17 e Th1 no linfonodo mesentérico e lâmina própria de camundongos Rag1^{-/-} após transferência de Linfócitos CD4⁺ WT e AIM2^{-/-}

Figura 16 – Frequência de Linfócitos CD4⁺ROR γ t⁺ e CD4⁺FOXP3⁺ no linfonodo mesentérico e lâmina própria de camundongos Rag1^{-/-} após transferência de Linfócitos CD4⁺ WT e AIM2^{-/-}

Figura 17 – Ativação de AIM2 por dsDNA em macrófagos e linfócitos Th17

Figura 18 – Expressão de genes relacionados ao perfil de linfócitos Th17

Figura 19 – Fosforilação de STAT3 em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}

Figura 20 – Expressão de ROR γ t em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}

Figura 21 – Expressão de IL-1R1 e IL-23R em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}

Figura 22 – Expressão de FOXP3 em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}

Figura 23 – Expressão de AIM2 no citoplasma e núcleo de linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}

Figura 24 – Interação entre AIM2 e ROR γ t em Linfócitos Th17

Figura 25 – Mecanismo de AIM2 na diferenciação de linfócitos Th17

Tabela I. Informações de anticorpos e reagentes utilizados para a diferenciação de células T helpers

Tabela II. Informações de anticorpos e reagentes utilizados

Tabela III. Sequências de primers utilizados nas análises de qPCR

LISTA DE ABREVIACOES

AIM2 - *Absent in melanoma 2*

ASC - Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

CARD - caspase recruitment domain

CFSE - *carboxifluoresceína succinimidil éster*

dsDNA – Double stranded DNA

GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GP130 - Glycoprotein 130

HBV - vírus da hepatite B

HCMV - Citomegalovírus humano

HIN-200 - hematopoietic interferon-inducible nuclear proteins with a 200-amino-acid repeat

IFN- γ – Interferon gamma

IFNAR – receptor de interferon- α/β

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IL-17A – interleucina 17 A

IL-17F – interleucina 17 F

IL-17RA - receptor de IL-17^A

IL-18 – interleucina 18

IL-1 β – interleucina 1 beta

IL-22 –interleucina 22

IL-23 – interleucina 23

IL-6 – interleucina 6

IL-6R – receptor de interleucina 6

IRF4- Interferon regulatory factor 4

LES - lúpus eritematosos sistêmico

MCMV - Citomegalovírus murinho

mTOR - mammalian target of rapamycin

PYD - pyrin domain

ROR γ t - RAR-related orphan receptor gamma

SBF - bactérias segmentadas filamentosas

SPF - *Specific-pathogen-free*

STAT3- (Signal Transducer And Activator Of Transcription 3)

TFh - linfócitos T foliculares

TGF- β - Transforming growth factor beta

Th1 – Linfócito T helper 1

Th17 – Linfócito T helper 17

Th2 – Linfócito T helper 2

TNBS - ácido trinitrobenzóico

TNF- fator de necrose tumoral

Treg- Células T reguladoras

WT – Wild type

SUMÁRIO

	Lista de figuras e tabelas	12
	Lista de abreviações	14
	Resumo	19
	Abstract	21
1	<i>Introdução</i>	23
1.1	<i>Absent in melanoma 2 (AIM2)</i>	24
1.2	Bases estruturais e bioquímicas da ativação de AIM2	25
1.3	Importância de AIM2 na defesa do hospedeiro	26
1.4	Envolvimento de AIM2 na inflamação estéril e doenças autoimunes	27
1.5	Evidências das funções de AIM2 em Linfócitos T e B	29
1.6	Biologia do Linfócito Th17	31
1.7	Importância de Linfócitos Th17 na homeostasia e inflamação intestinal	33
2	<i>Objetivos</i>	36
2.1	Objetivo geral	37
2.2	Objetivo específico	37
3	<i>Materiais e Métodos</i>	38
3.1	Animais	39
3.2	Obtenção e diferenciação de linfócitos T CD4 ⁺ para o perfil Th17	39
3.3	Fenotipagem de leucócitos por citometria de fluxo (FACS)	41
3.4	PCR em tempo real	42
3.5	Western blot	43
3.6	Fracionamento nuclear	44
3.7	Ensaio de co-immunoprecipitação	44
3.8	Imunofluorescência	44
3.9	Modelo de colite induzida por transferência adotiva de linfócitos T CD4 para camundongos Rag1 ^{-/-}	45
3.10	Isolamento de células da lâmina própria do colón	45
3.11	Análise histológica	46
3.12	Proliferação de linfócitos e ensaios de células de morte	46
3.13	Cultura de macrófagos derivados da medula óssea (BMMs) linfócitos Th17 com agonista de AIM2 (Poly dA:dT)	46

3.14	Análise <i>in silico</i> de dados públicos de ATAC-seq e de sequenciamento de imunoprecipitação de cromatina (ChIP seq)	47
3.15	Análise estatística	48
4	<i>Resultados</i>	49
4.1	A expressão de AIM2 é regulada positivamente durante a diferenciação de linfócitos Th17	50
4.2	A expressão de AIM2 está aumentada em linfócitos Th17 patogênicos	52
4.3	O receptor AIM2 é expresso em linfócitos Th17 na mucosa intestinal	54
4.4	A sinalização de TGF- β e IL-6 induz a expressão de AIM2 em linfócitos Th17	57
4.5	Aumento na acessibilidade da cromatina na região promotora de <i>Aim2</i> em linfócitos Th17	59
4.6	A região promotora de <i>Aim2</i> está ocupada por diferentes fatores de transcrição relacionados a diferenciação de linfócitos Th17	61
4.7	AIM2 atua como um regulador positivo na diferenciação de linfócitos Th17 e produção de IL-17A	63
4.8	A deficiência de AIM2 não altera a proliferação e viabilidade de linfócitos Th17	65
4.9	A deficiência de AIM2 não altera a diferenciação <i>in vitro</i> de linfócitos Th1, Th2 e iTreg	67
4.10	Redução da produção de IL-17A por linfócitos T CD4 ⁺ deficientes de AIM2 ^{-/-} <i>in vivo</i>	69
4.11	Linfócitos T CD4 ⁺ deficientes de AIM2 produzem menos IL-17A e IFN- γ e protegem contra colite induzida pela transferência de linfócitos T em camundongos Rag1 ^{-/-}	73
4.12	dsDNA não ativa AIM2 em linfócitos Th17	79
4.13	AIM2 regula o perfil transcricional de linfócitos Th17	81
4.14	AIM2 não altera a fosforilação do fator de transcrição STAT3 em linfócitos Th17	83
4.15	AIM2 é necessário para a expressão de ROR γ t em linfócitos Th17	85
4.16	AIM2 regula a expressão dos receptores IL-1R1 e IL-23R em linfócitos Th17	87
4.17	AIM2 regula a expressão de FOXP3 em linfócitos Th17	89

4.18	AIM2 localiza-se no citoplasma e núcleo de linfócitos Th17 e interage fisicamente com RORyt	91
5	Discussão	94
6	Conclusão	101
7	Referências bibliográficas	104

RESUMO

LEITE, J.A. **Importância do receptor AIM2 na diferenciação e regulação das funções efetoras de linfócitos T_H17**. 2022. Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2022.

O receptor AIM2 é um sensor citosólico de DNA envolvido no reconhecimento de DNA de bactérias, fungos, vírus ou células danificadas. Existem muitos estudos sobre a função do AIM2 em macrófagos, células dendríticas, entretanto, sua função nos linfócitos T ainda é pouco estudada. No presente estudo, objetivamos avaliar o papel do receptor AIM2 na diferenciação e função dos linfócitos Th17. Desta forma, a hipótese desse estudo é que a expressão de AIM2 em linfócitos T CD4⁺ é necessária para a diferenciação de linfócitos Th17. Inicialmente, para entender se AIM2 desempenha um papel na diferenciação de linfócitos Th17, isolamos linfócitos T CD4⁺ naíveis do baço e linfonodos de camundongos WT e AIM2^{-/-} e cultivamos essas células sob condições de diferenciação de linfócitos Th17 e 96 horas depois, avaliamos a produção de IL-17A por citometria de fluxo e ELISA. Além disso, foram realizadas análises de qPCR, WB e co-immunoprecipitação (CO-IP) em linfócitos Th17 de animais WT e AIM2^{-/-} para identificar um possível mecanismo de AIM2 em células Th17. Nossos resultados demonstraram que a ausência de AIM2 prejudicou a produção de IL-17A por linfócitos Th17, fato este associado a menor expressão de ROR γ t, IL-23R e IL1R1. Além disso, AIM2 é altamente expresso 36h após a diferenciação das células Th17, e é expresso células Th17 patogênicas. Curiosamente, a análise proteica e de microscopia confocal revelou que AIM2 é expresso no núcleo de células Th17. As análises de co-immunoprecipitação e microscopia confocal demonstraram que AIM2 interage com ROR γ t em linfócitos Th17. A fim de entender se AIM2 também regula a diferenciação de células Th17 *in vivo*, usamos o modelo de colite induzida por transferência adotiva de linfócitos T em camundongos Rag1^{-/-}. De forma interessante, observamos que camundongos Rag1^{-/-} que receberam linfócitos T CD4⁺CD45RB^{high} deficientes de AIM2 não perderam peso, bem como apresentaram maior comprimento do cólon e menos inflamação do cólon, o que indica que a transferência de células T CD4⁺ deficientes de AIM2 falha em induzir colite em Rag1^{-/-}. Esses sinais de proteção da inflamação intestinal foram associados à produção diminuída de IL-17A/IFN γ e menor expressão de ROR γ t em células T CD4⁺ deficientes em AIM2 na lâmina própria

do cólon, mLNs e baço quando comparado aos camundongos Rag1^{-/-} que receberam linfócitos CD4⁺ WT. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a expressão de AIM2 em células T CD4⁺ contribui para a diferenciação de células Th17 e inflamação intestinal através da regulação da função do fator de transcrição ROR γ t.

Palavras chave: Linfócitos Th17, AIM2, Inflamação intestinal.

ABSTRACT

LEITE, J.A. **Importance of the AIM2 receptor in the differentiation and regulation of the effector functions of Th17 cells.** 2022. Doctoral Thesis – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2022.

The AIM2 receptor is a cytosolic DNA sensor involved in the recognition of DNA from damaged bacteria, fungi, viruses or cells. There are many studies on the function of AIM2 in macrophages, dendritic cells, however, its function in T cells remains poorly studied. In the present study, we aimed to evaluate the role of the AIM2 receptor in the differentiation and function of Th17 cells. Thus, the hypothesis of this study is that the expression of AIM2 in CD4⁺ T cells is necessary for the differentiation of Th17 cells. Initially, to understand whether AIM2 plays a role in Th17 cells differentiation, we isolated naive CD4⁺ T cells from the spleen and lymph nodes of WT and AIM2^{-/-} mice and cultured these cells under Th17 cells differentiation conditions and 96 hours later, we evaluated the IL-17A production by flow cytometry and ELISA. In addition, qPCR, WB and co-immunoprecipitation (CO-IP) analyzes were performed on Th17 cells from WT and AIM2^{-/-} mice to identify a possible mechanism of AIM2 in Th17 cells. Our results showed that the absence of AIM2 impaired the production of IL-17A by Th17 cells, which is associated with lower expression of ROR γ t, and IL1R1. Furthermore, AIM2 is highly expressed 36h after Th17 cell differentiation, and pathogenic Th17 cells expressed higher levels of AIM2. Interestingly, protein analysis and confocal microscopy revealed that AIM2 is expressed in the nucleus of Th17 cells. Co-immunoprecipitation and confocal microscopy analyzes demonstrated that AIM2 interacts with ROR γ t in Th17 cells. In order to understand whether AIM2 also regulates Th17 cell differentiation *in vivo*, we used the model of colitis induced by adoptive transfer of T cells in Rag1^{-/-} mice. Interestingly, we observed that Rag1^{-/-} mice that received AIM2-deficient CD4⁺CD45RB^{high} T cells did not lose weight, as well as exhibit greater colonic length and less colon inflammation, which indicates that the transfer of CD4-deficient T cells in AIM2 fails to induce colitis in Rag1^{-/-}. These less clinical signs of intestinal inflammation were associated with decreased IL-17A/IFN γ production and lower ROR γ t expression in AIM2-deficient CD4⁺ T cells in the colon lamina propria, mLNs, and spleen when compared to Rag1^{-/-} mice that received lymphocytes. CD4 WT. Taken together, our results suggest that AIM2 expression on CD4⁺ T cells

contributes to Th17 cell differentiation and intestinal inflammation through regulation of ROR γ t transcription factor function

Keywords: Th17 cells, AIM2, Intestinal inflammation.

1.Introdução

1.1 *Absent in melanoma 2 (AIM2)*

O receptor *Absent in melanoma 2 (AIM2)* é um membro da família de proteínas HIN-200 induzíveis por interferon. Os membros desta família incluem proteínas que são caracterizadas por um domínio de sequência conservado de aproximadamente 200 aminoácidos (DAWSON; TRAPANI, 1996).

AIM2 foi descrito pela primeira vez como um gene supressor de crescimento de células tumorais. Em resumo, uma linhagem de células de melanoma humano com deleção em parte do cromossomo 6 foi transfectada com uma cópia do tipo selvagem (WT) do cromossomo 6 resultando em uma redução do crescimento de células tumorais *in vitro* e *in vivo* (TRENT et al., 1990). A clonagem dos genes que foram regulados de forma positiva e negativa após a introdução do cromossomo 6 nessa linhagem de melanoma resultou na identificação do AIM2.

A expressão de AIM2 na linhagem de células HL-60 é aumentada na presença de IFN- γ (DEYOUNG et al., 1997). Além disso, AIM2 tem um peso molecular estimado em 39 kDa e localiza-se no citoplasma. De forma interessante, a expressão de AIM2 em fibroblastos murinos retarda a proliferação destas células. Não obstante, a superexpressão de AIM2 em fibroblastos aumenta a suscetibilidade à morte celular (CHOUBEY et al., 2000).

As observações iniciais entre os anos 1990-2000 identificaram AIM2 como um alvo que promove o efeito inibitório do crescimento celular induzido por IFN- γ . Contudo, as funções de AIM2 em outros tipos celulares, em especial células do sistema imune, permaneceriam não elucidadas até meados de 2009.

Mais de uma década após sua identificação, diferentes grupos demonstraram que AIM2 desempenha um papel importante nas células imunes inatas, atuando como um sensor de DNA de fita dupla (dsDNA). Em macrófagos, AIM2 é expresso no citosol, onde pode se ligar diretamente no dsDNA de patógenos fagocitados. A ligação do DNA ao AIM2 inicia a montagem do inflamassoma de AIM2 induzindo a ativação de AIM2 e a interação de seus domínios PYD com a proteína adaptadora ASC. O domínio PYD de AIM2 se liga diretamente ao domínio PYD de ASC. ASC contém um domínio CARD que interage com o domínio CARD da caspase-1 levando ao recrutamento da caspase-1 para o complexo inflamassoma de AIM2 e subsequente

processamento de pró-IL1 β , pró-IL18 e gasdermina-D (GSDMD) (FERNANDES-ALNEMRI et al., 2009; HORNUNG et al., 2009; ROBERTS et al., 2009).

Além de macrófagos, as funções de AIM2 como sensor de DNA foram descritas também em células dendríticas em modelos de infecções bacterianas e virais (COSTA FRANCO et al., 2019; EICHHOLZ et al., 2016).

1.2 Bases estruturais e bioquímicas da ativação de AIM2

A estrutura de AIM2 tem sido extensivamente estudada desde sua identificação como sensor de DNA. Desta forma, estruturalmente AIM2 é caracterizado por um domínio C-terminal HIN (do inglês: *hematopoietic, interferon-inducible, and nuclear localization*) e um domínio N-terminal PYD (pirina) (WANG; TIAN; YIN, 2019).

O domínio HIN é o local onde ocorre a ligação de DNA de dupla fita quando este está presente no citoplasma. Nesse sentido, o domínio HIN é composto por duas dobras de OB (ligação de oligonucleotídeo/oligossacarídeo), que se liga a ambas as fitas de DNA. Isso explica por que o receptor AIM2 é capaz de reconhecer dsDNA, em vez de ssDNA (JIN et al., 2012; THEOBALD; MITTON-FRY; WUTTKE, 2003). A ligação de dsDNA no domínio HIN-200 de AIM2 ocorre através de interações eletrostáticas (ROBERTS et al., 2009), ao passo que as dobras OB contêm resíduos de arginina e lisina carregados positivamente que se associam com os fosfatos carregados negativamente na estrutura da ribose das moléculas de DNA (WANG; TIAN; YIN, 2019; WANG; YIN, 2017). Não obstante, várias moléculas de AIM2 podem se ligar a mesma molécula de dsDNA formando um aglomerado de moléculas de AIM2 para iniciar a formação do inflamassoma (LU et al., 2015). A ativação de AIM2 por dsDNA ocorre independente da sequência de DNA, contudo, depende de seu tamanho, ao passo que 70 pares de base (pb) de dsDNA é o tamanho mínimo necessário para ativar AIM2 (JIN et al., 2012). De forma interessante, a ativação de AIM2 ocorre mais rapidamente na presença de moléculas de dsDNA longas, como por exemplo 300pb (MATYSZEWSKI; MORRONE; SOHN, 2018), o que indica que o tamanho da molécula de dsDNA é um fator importante para regular a ativação de AIM2.

O domínio PYD de AIM2 é responsável pelo recrutamento da proteína adaptadora ASC durante a montagem do inflamassoma (HYUN et al., 2007). O

domínio PYD de AIM2 se liga diretamente ao domínio PYD de ASC resultando na montagem de filamentos helicoidais, permitindo a oligomerização do inflamassoma de AIM2 (WANG; TIAN; YIN, 2019). Assim que a dupla fita de DNA se liga no domínio HIN-200, ocorre uma mudança conformacional que resulta na liberação do domínio PYD de HIN-200 tornando-o acessível para a interação com o domínio PYD de ASC (JIN et al., 2012). ASC é uma molécula adaptadora que atua no recrutamento de caspase-1 através da interação dos domínios CARD de ambas moléculas (WANG; TIAN; YIN, 2019). A montagem do inflamassoma de AIM2 permite que as moléculas de caspase-1 estejam próximas umas das outras, resultando na geração auto catalítica de moléculas de caspase-1 ativas e posterior clivagem proteolítica das citocinas pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas maduras (KUMARI et al., 2020).

1.3 Importância de AIM2 na defesa do hospedeiro

O reconhecimento de dsDNA derivado de microrganismos por AIM2 ativa células da imunidade inata e promove o reconhecimento e elaboração de respostas efetoras direcionadas a patógenos culminando no reconhecimento e resposta antimicrobiana do hospedeiro (KUMARI et al., 2020).

A ativação de AIM2 promove um papel protetor contra bactérias intracelulares e extracelulares. Bactérias como *Listeria* e *Francisella* são bactérias intracelulares capazes de se replicar no interior de macrófagos e células dendríticas. AIM2 é ativado pelo dsDNA destas bactérias após a lise das mesmas e liberação do DNA no citoplasma (RATHINAM et al., 2010). A ativação do inflamassoma de AIM2 também protege contra infecção por *Micobacterium tuberculosis*, ao passo que camundongos deficientes de AIM2 são mais suscetíveis à infecção por essa bactéria (SAIGA et al., 2012). Bactérias como *Porphyromonas gengivalis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia muridarum* e *C. trachomatis* também induzem a ativação do inflamassoma de AIM2 em macrófagos *in vitro* (GE et al., 2012; RATSIMANDRESY et al., 2017; YANG et al., 2013). Não obstante, AIM2 também é importante na resposta contra bactérias extracelulares como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (FANG et al., 2011; FENG et al., 2019; HANAMSAGAR; ALDRICH; KIELIAN, 2014).

A ativação de AIM2 também é importante para proteção do hospedeiro contra infecções fúngicas ao passo que camundongos deficientes de AIM2 são

suscetíveis a infecção por *Aspergillus fumigatus* (KARKI et al., 2015). Também se encontra relatos na literatura da ativação de AIM2 por diferentes tipos de protozoários como por exemplo *Plasmodium berghei* (YU et al., 2018), *Leishmania spp* (GUPTA et al., 2019) e *Toxoplasma gondii* (FISCH et al., 2019).

A ativação de AIM2 promove um papel vital durante infecções por vírus de DNA. Estudos prévios demonstraram que o DNA do Citomegalovírus murino (MCMV) induz a ativação de AIM2 em macrófagos e células dendríticas levando a produção de IL-1 β e IL-18 dependente da ativação de caspase-1, ao passo que a ativação de AIM2 promove o controle da replicação viral (RATHINAM et al., 2010). De forma semelhante, o Citomegalovírus humano (HCMV) induz a ativação de AIM2 e produção de IL-1 β em células THP1 (BOTTO et al., 2019). AIM2 também responde contra o vírus vaccínia em macrófagos e células dendríticas (RATHINAM et al., 2010), assim como o vírus da hepatite B (HBV), e o papiloma vírus humano (HPV) (REINHOLZ et al., 2013).

Desta forma, a ativação do inflamassoma de AIM2 e, consequente produção de IL-1 β e IL-18, constituem um mecanismo crítico que contribui para a o reconhecimento e a resposta aos diferentes tipos de patógenos.

1.4 Envolvimento de AIM2 na inflamação estéril e doenças autoimunes

Alterações na expressão de AIM2 têm sido observadas em diferentes tipos de doenças autoimunes/inflamatórias, como por exemplo, artrite reumatoide, psoríase, colite, diabetes tipo 1 e lúpus eritematoso sistêmico. (Revisado por KUMARI et al., 2020).

A ativação do receptor AIM2 parece ser importante para o desenvolvimento da poliartrite uma vez que o aumento da expressão de caspase-1 clivada e IL-1 β foi observado nas articulações de camundongos deficientes de IFNAR e Dnase II. Nesse sentido, a deficiência de AIM2 foi associada com menor desenvolvimento de artrite reumatoide em modelo experimental, ao passo que tal melhora foi acompanhada de redução na infiltração de macrófagos, inflamação articular, e destruição óssea e das cartilagens (JAKOBS; PERNER; HORNUNG, 2015).

A expressão aumentada de AIM2 também foi observada nos queratinócitos nas lesões de pele de pacientes com psoríase quando comparado a pele saudável. Nesse sentido, o dsDNA foi capaz de ativar AIM2 em

queratinócitos. De forma interessante, o peptídeo antimicrobiano LL37, que foi altamente expresso nas lesões psoriáticas, sequestra DNA e impediu a ativação de AIM2 em queratinócitos. Desta forma, essas observações sugerem que AIM2 é ativado por DNA próprio durante a psoríase e esse processo é regulado por LL37 (DOMBROWSKI et al., 2011).

A ativação de AIM2 na mucosa intestinal parece estar relacionada com proteção contra a disbiose e desenvolvimento da colite. Nesse sentido, Hu et al. (2015) observaram que camundongos AIM2^{-/-} são suscetíveis ao desenvolvimento da colite induzida por DSS ou pela inflamação intestinal induzida pela infecção com *Escherichia coli*. Tais eventos foram associados com uma significativa redução na produção de IL-1 β e IL-18, o que demonstra que ativação do inflamassoma de AIM2 é importante para controlar o crescimento de *E. coli* e proteger contra a inflamação intestinal. Não obstante, os autores observaram que o desenvolvimento exacerbado de colite na ausência de AIM2 estava associada com significativa redução na expressão de peptídeos antimicrobianos, como RegIII β , RegIII γ , S100A8 e S100A9. Em suma, os autores acreditam que a ativação de AIM2 regula a produção de peptídeos antimicrobianos o que contribui para a manutenção da homeostase intestinal (HU et al., 2015). Resultados semelhantes foram encontrados por Ratsimandresy et al., (2017), no qual a deficiência de AIM2 foi associada com perda na produção de IL-18, e redução na expressão da proteína de ligação à IL-22 (IL-22BP) em células epiteliais intestinais e consequente redução na expressão dos peptídeos antimicrobianos dependentes de STAT3 (REGIII β e REGIII3 γ) (RATSIMANDRESY et al., 2017). Desta forma, os resultados destes estudos apontam um papel central do receptor AIM2 na prevenção da disbiose e inflamação intestinal por meio da regulação da produção de peptídeos antimicrobianos de forma dependente da produção de IL-18.

A ativação de AIM2 também parece ser importante para controlar o desenvolvimento do diabetes tipo 1 em um modelo experimental. De forma interessante, a expressão de AIM2 é aumentada no pâncreas de pacientes com DM1, e em células CD11b⁺ nos linfonodos pancreáticos e no íleo de camundongos diabéticos. A administração de estreptozotocina em camundongos AIM2^{-/-} promoveu uma alta suscetibilidade no desenvolvimento de DM1 observada por níveis elevados de glicose e redução significativa de insulina no sangue. Tal suscetibilidade foi ainda associada com aumento na frequência

de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ produtores de IFN- γ nos linfonodos pancreáticos de camundongos deficientes de AIM2 quando comparado aos WT diabéticos. De forma interessante, camundongos AIM2^{-/-} diabéticos possuem alterações na composição da microbiota intestinal e expressão de proteínas de junção do epitélio intestinal como ZO-1 e claudina-2 e de peptídeos antimicrobianos como RegIII γ que foram associadas com aumento na permeabilidade intestinal e translocação de bactérias da microbiota intestinal para os linfonodos pancreáticos. Desta forma, os resultados desse estudo demonstraram que ativação de AIM2 parece ser importante para controlar a permeabilidade intestinal e translocação de bactérias da microbiota intestinal para os linfonodos pancreáticos, controlando o desenvolvimento de linfócitos T autorreativos contra as células beta pancreáticas produtoras de insulina (LEITE et al., 2020).

A expressão de AIM2 está intimamente correlacionada com a gravidade da doença em pacientes e em camundongos com lúpus eritematosos sistêmico (LES). A expressão de AIM2 foi significativamente aumentada em macrófagos induzidos por DNA de células apoptóticas e correlacionada com a ativação de macrófagos. Não obstante, o bloqueio da expressão de AIM2 melhorou notavelmente o LES por impedir a ativação de macrófagos e diminuir a resposta inflamatória em camundongos (ZHANG et al., 2013). Um estudo recente demonstrou que a deficiência de AIM2 em linfócitos B foi associado com a proteção ao desenvolvimento de LES. Neste estudo, observou-se que expressão de AIM2 em linfócitos B contribuindo para diferenciação de linfócitos B e contribui para a patogênese da doença (YANG et al., 2021).

1.5 Evidências das funções de AIM2 em Linfócitos T e B

Como mencionado nos tópicos anteriores, o receptor AIM2 foi inicialmente identificado em linhagens de células tumorais e fibroblastos como supressor da proliferação celular e, posteriormente, como um sensor de dsDNA em macrófagos e células dendríticas. Contudo, estudos recentes têm demonstrado que AIM2 desempenha funções canônicas e não-canônicas em linfócitos T e B.

A expressão de AIM2 é aumentada em linfócitos B e essas células produzem altos níveis de IL-1 β após estímulo *in vitro* com o agonista de AIM2, o Poly dA:dT (SVENSSON et al., 2017). Não obstante, El-Zaatari et al. (2020) demonstraram elevada expressão de AIM2 em linfócitos B isolados de tecidos

gástricos de camundongos infectados com *Helicobacter felis*. De forma interessante, linfócitos B deficientes de AIM2 produzem níveis elevados de CXCL16 que contribui para o recrutamento de linfócitos T CD8⁺ para o tecido gástrico e promove a inflamação deste tecido após a infecção, sugerindo um mecanismo intrínseco de AIM2 na regulação da produção da quimiocina CXCL16 por linfócitos B (EL-ZAATARI et al., 2020). No estudo de Yang et al. (2021), observou-se que AIM2 é altamente expresso em linfócitos B do centro germinativo, linfócitos B de memória e plasmócitos isolados em pacientes com LES. De forma interessante, a deficiência de AIM2 em linfócitos B reduziu a frequência de linfócitos B CD19⁺ nos linfonodos e baço, assim como apresentaram redução na produção de IgG1. Nesse sentido, camundongos com deleção de AIM2 em linfócitos B são protegidos contra o desenvolvimento de LES, ao passo que tal proteção está associada com redução na frequência de linfócitos B do centro germinativo, linfócitos T foliculares (Tfh) e plasmócitos. A deficiência de AIM2 em linfócitos B ainda é associada com redução na expressão do fator de transcrição Bcl-6 e aumento da expressão de Blimp-1. Desta forma, os resultados desse estudo demonstraram que AIM2 desempenha um papel importante na diferenciação de linfócitos B no LES (YANG et al., 2021).

Um dos primeiros trabalhos a relatar a expressão de AIM2 em linfócitos T, foi o estudo de Komori et al., (2015), no qual os autores buscaram avaliar o perfil de metilação de dinucleotídeos CpG em regiões promotoras de genes entre linfócitos CD4⁺ T naïves e de memória. De forma interessante, os autores observaram um elevado perfil de metilação e expressão gênica de AIM2 entre linfócitos T CD4⁺ de memória quando comparado a linfócitos T naïves. Contudo, até o presente momento não existe evidências na literatura demonstrando a função de AIM2 em linfócitos T CD4⁺ de memória (KOMORI et al., 2015).

Um estudo recente demonstrou que a expressão de AIM2 em linfócitos T CD4⁺ é necessária para a função de células T reguladoras (Tregs). Em resumo, Tregs deficientes em AIM2 exibem uma expressão comprometida do fator de transcrição FOXP3, que foi associado com aumento da fosforilação de AKT e sinalização aprimorada de mTOR e Myc. AIM2 interage com as fosfatases RACK1-PP2A com o objetivo de controlar a fosforilação de AKT contribuindo para a estabilidade do fator de transcrição FOXP3 e para a função Tregs nos tecidos (CHOU et al., 2021). Esse foi o primeiro estudo a demonstrar os mecanismos de AIM2 em linfócitos T CD4⁺.

Em linha com o estudo anterior, Wu et al., (2022) demonstraram que AIM2 é um regulador positivo da diferenciação de linfócitos T foliculares (TFh). De forma interessante, AIM2 é altamente expresso em TFh e a deficiência de AIM2 reduz significativamente a resposta dessas células. Não obstante, os autores observaram que AIM2 está localizado no núcleo de TFh e interage com o fator de transcrição c-MAF regulando de maneira positiva a diferenciação dessas células (WU et al., 2022).

Ainda não existem estudos que demonstrem a função de AIM2 em outros subtipos de linfócitos T CD4⁺ como Th1, Th2 e Th17, contudo, um estudo do nosso grupo demonstrou que camundongos AIM2^{-/-} submetidos a um modelo experimental de diabetes tipo 1 induzido por estreptozotocina, possuem uma significativa redução na frequência de linfócitos Th17 nos linfonodos pancreáticos e linfonodos mesentéricos, assim como diminuição nos níveis da IL-17A no pâncreas e intestino delgado quando comparados a camundongos WT (LEITE et al., 2020). Não obstante, o estudo de Wu et al., (2022) demonstrou que a expressão de AIM2 está significativamente aumenta em linfócitos Th17, Th1, Th2 e TFh. Desta forma, é possível que AIM2 participe da diferenciação de linfócitos Th17.

1.6 Biologia do Linfócito Th17

Linfócito Th17 é um tipo de linfócito T CD4⁺ caracterizado pela produção das citocinas IL-17A, IL-17F e IL-22, e é uma importante população de células para a imunidade protetora contra bactérias e fungos e na homeostase nas superfícies de mucosa. Contudo, respostas desreguladas de linfócitos Th17 compreendem um importante fator na patogênese de diversas doenças autoimunes, como as doenças inflamatórias intestinais, psoríase e esclerose múltipla (GOTO, 2014; STOCKINGER; OMENETTI, 2017).

A história relacionada a descoberta de linfócitos Th17 inicia-se por volta do ano de 2005 quando Langrish e colaboradores demonstraram que a citocina IL-23p19 promovia a diferenciação de um subtipo de linfócito T auxiliar com características distintas das subpopulações até então caracterizadas Th1, Th2 e Treg. Nesse estudo, os autores observaram que a citocina IL-23 induz a produção de IL-17A, IL-17F, TNF e IL-6 por uma população de linfócito T ativado. De forma interessante, a transferência adotiva dessa subpopulação em

camundongos naíves promoveu a invasão destas células no sistema nervoso central e desenvolvimento de encefalomielite experimental, um modelo experimental de Esclerose múltipla (LANGRISH et al., 2005).

Naquela época, a descoberta de um novo possível subtipo de linfócito T auxiliar foi notória e intrigante levando outros grupos a investigarem os mecanismos envolvidos no desenvolvimento desse novo subtipo de célula. Neste sentido, pouco mais de um ano após a publicação do primeiro artigo relatando a existência de um novo subtipo de linfócito T produtor de IL-17, três diferentes grupos publicaram artigos nos periódicos *Immunity* e *Nature* relatando os mecanismos pelos quais ocorria a diferenciação de linfócitos Th17. De forma interessante, estes estudos descreveram respectivamente que a produção de TGF- β e IL-6 por células dendríticas era necessária para a diferenciação de linfócitos Th17 e produção de IL-17A por linfócitos T ativados (BETTELLI et al., 2006; MANGAN et al., 2006; VELDHOEN et al., 2006). Alguns anos mais tarde, a citocina IL-1 β foi identificada como um outro fator importante para a diferenciação de linfócitos Th17 (CHUNG et al., 2009a).

Ainda no ano de 2006, um outro importante achado ajudaria a concretizar a descoberta da população de linfócitos Th17. De forma interessante, Ivanov et al. (2006) observaram que o fator de transcrição ROR γ t é altamente expresso em populações de linfócitos T da mucosa intestinal, em especial os linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17A. A deficiência de ROR γ t reduziu drasticamente a produção de IL-17A por linfócitos T CD4⁺, demonstrando que a indução da diferenciação de linfócitos Th17 necessitava deste fator de transcrição (IVANOV et al., 2006a).

Posteriormente, foi descoberto que além de ROR γ t, um outro fator de transcrição era necessário para a diferenciação de linfócitos Th17. De forma interessante, Wei et al. (2007) demonstraram que linfócitos Th17 produziam a citocina IL-21 e que ela era produzida de maneira dependente do fator de transcrição STAT3. Nesse sentido, a citocina IL-21 atua como um importante fator para a manutenção da estabilidade de STAT3 (WEI et al., 2007). Ainda no mesmo ano, Nishihara et al. (2007) demonstraram que a sinalização de IL-6 em seu receptor IL-6R através da subunidade gp130, promovia a produção de IL-17A por linfócitos Th17, sendo essencial para a diferenciação e expressão de ROR γ t (NISHIHARA et al., 2007). Além de STAT3, um outro fator de transcrição importante para diferenciação de linfócitos Th17 é o IRF4. Camundongos

deficientes de IRF4 possuem diferenciação Th17 prejudicada associada com redução na expressão de ROR γ t (BRÜSTLE et al., 2007).

Os estudos citados acima foram os primeiros a identificar e caracterizar a população de linfócitos Th17. Hoje, mais de uma década após a descoberta desta subpopulação de linfócitos T CD4⁺ inúmeros estudos têm identificado moléculas acessórias que ajudam a manter o fenótipo deste subtipo celular.

1.7 Importância de Linfócitos Th17 na homeostasia e inflamação intestinal

Dependendo do microambiente, os linfócitos Th17 podem exercer funções protetoras ou patogênicas. Na mucosa intestinal, linfócitos Th17 são gerados pela presença de bactérias segmentadas filamentosas (SFB), sendo essenciais para a proteção da barreira intestinal. Contudo, a desregulação na composição da microbiota intestinal causada por patobiontes, pode desencadear a diferenciação de linfócitos Th17 patogênicos e causar o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais (STOCKINGER; OMENETTI, 2017).

Em camundongos WT mantidos em condições livres de patógenos-específicos (SPF, do inglês: *Specific-pathogen-free*), os linfócitos Th17 estão presentes na lâmina própria do intestino delgado e outros tecidos de mucosa. Essa observação sugere que linfócitos Th17 são células especializadas em controlar os desafios do microambiente de mucosas onde estão presentes uma grande variedade de microrganismos. Desta forma, elas são uma importante população de células que auxilia na manutenção da tolerância nos tecidos de mucosa aos antígenos microbianos residentes e aos antígenos alimentares (IVANOV; ZHOU; LITTMAN, 2007).

Os linfócitos Th17 são essenciais para manutenção da homeostase intestinal. Essa função está relacionada com a produção de suas citocinas IL-17 e IL-22, que são importantes fatores para regulação da expressão de proteínas de junção e permeabilidade intestinal e produção de peptídeos antimicrobianos como lectinas do tipo C, REGIII β e REGIII γ (HOU; BISHU, 2020). Além disso, linfócitos Th17 desempenham um importante papel no desenvolvimento da arquitetura da mucosa intestinal, assim como na indução da produção de IgA e maturação pós-natal da imunidade de mucosa intestinal (GABORIAU-ROUTHIAU et al., 2009; SCHNUPF et al., 2017; SCHNUPF; GABORIAU-

ROUTHIAU; CERF-BENSUSSAN, 2013). Todas essas funções são dependentes da expressão do fator de transcrição ROR γ t, identificado inicialmente como o principal fator de transcrição envolvido na produção de IL-17A por linfócitos T CD4⁺ na mucosa intestinal (IVANOV et al., 2006b).

Apesar de seu papel protetor em condições de homeostase, os linfócitos Th17 também desempenham características patogênicas em condições inflamatórias, como as doenças inflamatórias intestinais, que incluem a colite ulcerativa e a doença de Crohn (LEPPKES et al., 2009). A primeira evidência da participação de IL-17 nas doenças inflamatórias intestinais foi proveniente de um estudo descritivo que demonstrou que o intestino inflamado de pacientes com colite ulcerativa ou doença de Crohn apresentava elevados níveis IL-17 quando comparado há indivíduos saudáveis (FUJINO et al., 2003). Nesse sentido, o papel de linfócitos Th17 na inflamação intestinal tem sido elucidado através de modelos experimentais de colite. Estudos demonstraram que a deficiência do receptor de IL-17A (IL-17RA) confere proteção à colite induzida por TNBS (ácido trinitrobenzóico), o que infere que a citocina IL-17 é necessária para o desenvolvimento da inflamação intestinal aguda (ZHANG et al., 2006). Não obstante, camundongos IL-17A^{-/-} ou IL-17F^{-/-} são protegidos da colite induzida por DSS e apresentam menor inflamação intestinal quando comparado a camundongos WT (ITO et al., 2008; YANG et al., 2008). De forma interessante, a transferência adotiva de linfócitos T CD4⁺CD45RB^{high} deficientes do fator de transcrição ROR γ t para camundongos Rag1^{-/-} protege contra o desenvolvimento de colite nestes animais, fato este associado com a redução na produção de IL-17A, GM-CSF, TNF-alpha e IFN- γ , assim como redução na infiltração de células dendríticas e neutrófilos na lâmina própria do intestino grosso (LEPPKES et al., 2009).

A habilidade de linfócitos Th17 em promover a inflamação intestinal é dependente da produção de citocinas e de alterações em sua plasticidade (STOCKINGER; OMENETTI, 2017). Nesse sentido, a plasticidade de linfócitos Th17 é alterada após infecção com *Helicobacter hepaticus* e *Citrobacter rodentium* e no modelo de colite induzida pela transferência de linfócitos T. Nestas condições, os linfócitos Th17 passam a produzir IL-17A e IFN- γ (AHLFORS et al., 2014; HARBOUR et al., 2015; MORRISON et al., 2013). O principal fator que promove a plasticidade de linfócitos Th17 para um perfil semelhante ao de Th1 é a citocina IL-23, ao passo que ausência de IL-23 previne

a produção de IFN- γ e GM-CSF por linfócitos Th17 (HIROTA et al., 2011). Desta forma, a patogenicidade de linfócitos Th17 na indução de colite depende de sua conversão em linfócitos Th17 produtores de IL-17A e IFN- γ de maneira dependente da expressão dos fatores de transcrição STAT4 e T-bet (HARBOUR et al., 2015). Tal característica de linfócitos Th17 de adotar um perfil semelhante ao dos linfócitos Th1 indica que a plasticidade dos linfócitos Th17 pode ser um dos principais fatores que promovem a inflamação intestinal (STOCKINGER; OMENETTI, 2017).

Tendo em vista que linfócitos Th17 representam uma importante população de células envolvidas em doenças inflamatórias/autoimunes e que ainda não existem evidências concretas da participação do receptor AIM2 na diferenciação dessas células, esse estudo tem a hipótese de que a expressão de AIM2 em linfócitos T CD4 é necessária para a diferenciação de linfócitos Th17.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar o perfil de expressão e a função do receptor AIM2 durante a diferenciação de linfócitos Th17.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o perfil de expressão do receptor AIM2 em linfócitos Th17;
- Determinar se a ativação de TCR, co-estimulação e citocinas polarizantes envolvidas na diferenciação de linfócitos Th17 (TGF- β e IL-6) alteram a expressão de AIM2 em linfócitos Th17;
- Caracterizar a localização celular de AIM2 em linfócitos Th17;
- Avaliar se a deficiência de AIM2 altera a diferenciação de linfócitos Th17;
- Compreender se a deficiência de AIM2 altera a expressão gênica e proteica dos fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de linfócitos Th17 (ROR γ t e STAT3); e
- Investigar se a expressão de AIM2 em linfócitos T CD4⁺ é necessária para a diferenciação e plasticidade de linfócitos Th17 e no desenvolvimento de colite no modelo induzido por transferência adotiva de linfócitos T CD4⁺CD45RB^{high}.

3 Materiais & Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6, machos, selvagens (*wild type* – WT) e deficientes em AIM2 ou em Rag1, entre 6 a 10 semanas de idade, pesando entre 20 e 25 gramas. Os camundongos AIM2^{-/-} são provenientes Genentech, South San Francisco, CA, com o nome de linhagem, Aim2^{tm1.2Arte}. Todos os procedimentos realizados estão de acordo com os princípios propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e submetidos à análise e aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de São Paulo (CEUA/FMRP: 124/2020; ICB: 7035150721).

3.2 Obtenção e diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para o perfil Th17

Linfócitos T CD4⁺ naïves foram isoladas do baço e linfonodos de camundongos WT e AIM2^{-/-}, através de *microbeads* recobertas com o anti-CD4 (clone L3T4, cat 130-117-043). Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha). Posteriormente, tais células foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos anti-CD4, anti-CD44, e anti-CD62L, e as células CD4⁺CD44^{lo}CD62L^{hi} foram isoladas por *sorting* (FACS Aria III sorter, BD Biosciences). Para a diferenciação dos subtipos de linfócitos T helper (cTh17 – Th17 convencional, pTh17 – Th17 patogênica, Th1, Th2 e iTreg), os linfócitos T CD4 obtidos a partir do *sorting*, foram colocados em placas de 48 poços revestidas com anticorpos anti-CD3 e na presença de anti-CD28 solúvel, e, posteriormente, foram estimulados com coquetel de citocinas e anticorpos neutralizantes de acordo com a tabela abaixo:

Tabela I. Informações de anticorpos e reagentes utilizados para a diferenciação de células T helpers

Subtipo de T helper	Citocina/Anticorpo	Concentração	Clone	Catálogo	Empresa
cTh17 (clássica)	Anti-CD3	4 µg/mL	145-2C11	553058	BD Biosciences
	Anti-CD28	2 µg/mL	37.51 RUO	553294	BD Biosciences
	TGFβ	2.5 ng/mL	-	7666-MB	R&D
	IL-6	20 ng/mL	-	216-16	Peptotech
	Anti-IFN-γ	1 µg/mL	XMG-1.2	554408	BD Biosciences
	Anti-IL-4	1 µg/mL	11B11	554432	BD Biosciences
	Anti-IL-2	1 µg/mL	JES6-1A12	554424	BD Biosciences
pTh17 (patogênica)	Anti-CD3	4 µg/mL	145-2C11	553058	BD Biosciences
	Anti-CD28	2 µg/mL	37.51 RUO	553294	BD Biosciences
	TGFβ	2.5 ng/mL	-	7666-MB	R&D
	IL-6	20 ng/mL	-	216-16	Peptotech
	IL-23	50 ng/mL	-	1887-ML	R&D
	IL-1 β	20 ng/mL	-	211-11B	Peptotech
	Anti-IFN-γ	1 µg/mL	XMG-1.2	554408	BD Biosciences
	Anti-IL-4	1 µg/mL	11B11	554432	BD Biosciences
	Anti-IL-2	1 µg/mL	JES6-1A12	554424	BD Biosciences
Th1	Anti-CD3	2 µg/mL	145-2C11	553058	BD Biosciences
	Anti-CD28	2 µg/mL	37.51 RUO	553294	BD Biosciences
	IL-12	20 ng/mL	-	212-12	Peptotech
	Anti-IL-4	1 µg/mL	11B11	554432	BD Biosciences
Th2	Anti-CD3	2 µg/mL	145-2C11	553058	BD Biosciences
	Anti-CD28	2 µg/mL	145-2C11	553058	BD Biosciences
	IL-4	10 ng/mL	-	214-14	Peptotech
	Anti-IFN-γ	1 µg/mL	XMG-1.2	554408	BD Biosciences
iTreg	Anti-CD3	2 µg/mL	145-2C11	553058	BD Biosciences
	Anti-CD28	2 µg/mL	145-2C11	553058	BD Biosciences
	TGFβ	10 ng/mL	-	7666-MB	R&D
	Anti-IFN-γ	1 µg/mL	XMG-1.2	554408	BD Biosciences

3.3 Fenotipagem de leucócitos por citometria de fluxo (FACS)

A análise quantitativa e fenotípica de células diferenciadas *in vitro* ou isoladas dos linfonodos, baço ou lâmina própria intestinal foi realizada por citometria de fluxo. Em resumo, após serem isoladas, as células foram contadas e avaliadas a viabilidade com azul de tripan. Posteriormente, as células foram plaqueadas em placa de 96 poços e estimuladas com acetato miristato de forbol (PMA) (50 ng/ml; Sigma Aldrich) e ionomicina (500 ng/ml; Sigma Aldrich), e brefeldina A (inibidor do transporte de golgi - 1,5µl/ml; BD Biosciences), por 4 horas em estufa à 37 °C (5% CO₂ e 8% de umidade). A quantidade de células utilizada foram 5x10⁵/células por poço para experimentos oriundos de cultura de *in vitro* de linfócitos ou 2x10⁶/células por poço para os experimentos *in vivo*. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e centrifugadas a 450g por 5 minutos e incubadas durante 15 minutos com Fc block (1:200) para o bloqueio de receptores Fc, e posteriormen lavadas com PBS 1x, centrifugadas a 450g por 5 e marcadas com marcador de viabilidade celular (Fixable viability dye; 1:1000; eBioscience) e anti-CD4 (1:200; BD Biosciences) por 10 minutos a temperatura ambiente (**Tabela II**). Em seguida, as células foram centrifugadas e fixadas utilizando o fixador do kit (*transcription factor staining buffer set*, eBioscience) por 60 minutos à temperatura ambiente, com posterior centrifugação. O próximo passo foi a marcação intracelular com anticorpos listados na tabela II por 60 minutos. Em resumo, os anticorpos foram diluídos no permeabilizante do kit e a células foram incubadas com tampão de permeabilização contendo o mix de anticorpos durante 60 minutos a 4°C. Após essa etapa, as células foram centrifugadas novamente e ressuspensas em PBS para aquisição por citometria de fluxo (FACS Canto II, BD Biosciences). Nesta etapa, foram adquiridas entre 100.000 a 250,000 eventos conforme o experimento. As análise das amostras foram realizadas no software FlowJO X (BD Biosciences).

Tabela II. Informações de anticorpos e reagentes utilizados

Reagente	Diluição	Clone	Catálogo	Empresa
αCD4 - PERCP	1:1000	GK1.5	100432	BD
αCD62L - FITC	1:200	MEL-14	104405	Biolegend
αCD44 - PE	1:400	IM7	12-0453	eBioscience
αCD45 – BV510	1:200	30-F11	103138	Biolegend
αTCR-β - PE	1:200	UC3-10A6	137706	Biolegend
αIL-17A - FITC	1:200	eBio17B7	11-7177	eBioscience
αIFNγ – PEcy7	1:1000	XMG1.2	25-7311	eBioscience
αRORγt – BV421	1:800	Q31-378	562894	BD
αFOXP3 - APC	1:400	FJK-16s	17-5773	eBioscience
αIL-1R1 APC	1:200	JAMA-147	113509	Biolegend
αIL-23R - PE	1:200	O78-1208	516803	Biolegend
αAIM2 - PE	1:200	2B10	652803	Biolegend
CD16/32 (Fc block)	1:200	2.4G2	553142	BD
FVD (live and dead) –APC-eFI780	1:1000	-	65-0865	eBioscience
FOXP3 permeabilization kit	-	-	00-5523-00	eBioscience

3.4 PCR em tempo real

Para avaliar a expressão gênica das culturas de linfócitos T Th17, as células foram coletadas e o RNA foi extraído usando Kit de extração de RNA (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram quantificadas em um nanodrop (ThermoFisher) e 500 ng de RNA foram convertidos a cDNA usando o *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (ThermFisher), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o cDNA, os *primers* e o *master mix Sybr Green* contendo os produtos da reação, como nucleotídeos e a polimerase. As reações foram realizadas com o aparelho StepOnePlus (ThermoFisher). Os resultados foram analisados através do *cycle threshold* (CT), sendo os dados normalizados pela expressão de *Gapdh* e a diferença entre os grupos calculada através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. As sequências dos *primers* utilizados estão descritas a seguir na tabela abaixo. Nenhum dos *primers* utilizados apresentou amplificação no grupo sem amostra (branco) ou mais de um pico na curva de *melting*. Além disso, todos os *primers* apresentaram eficiência superior a 90%.

Tabela III. Sequências de primers utilizados nas análises de qPCR

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>Aim2</i>	TCTGTCCTCAAGCTAAGCCTC A	GTGACAACAAGTGGATCTTTCTG TA
<i>Rorc</i>	GAGTTTGCCAAGCGGCTTT	TCCATTGCTCCTGCTTTTCAGTACA
<i>Rora</i>	TGGTTGAAGGATGTTCCACA	TGGTTG AAGGATGTTCCACA
<i>Stat3</i>	AGGAGTCTAACAACGGCAGCC T	GTGGTACACCTCAGTCTCGAA
<i>Foxp3</i>	TTCTCCAGGACAGACCACACT	TTCTCCAGGACAGACCACACT
<i>Il23r</i>	GCCAAGAAGACCATTCCCGA	TCAGTGCTACAATCTTCTTCAGA GG
<i>Il1r1</i>	AAGCTGACCCAGGATCAATG	TGGTTG AAGGATGTTCCACA
<i>Il17r</i>	CTGTATGACCTGGAGGCTTTC T	CGAGTAGACGATCCAGACCTTC
<i>Il17a</i>	GCTCCAGAAGGCCCTCAG	CTTCCCTCCGCATTGACA
<i>Il22</i>	CAGCTCCTGTACATCAGCGG T	AGGTCCAGTCCCCAATCGCCT
<i>Gapdh</i>	CATCTTCTTGTGCAGTGCCA	CGGCCAATCCGTTAC

3.5 Western blot

Para avaliar a expressão proteica de AIM2, as amostras foram coletas em tampão RIPA (Sigma Aldrich), homogenizada com inibidores de protease e fosfatase, centrifugadas, e coletado o sobrenadante. Em seguida, foi realizada a quantificação de proteínas por *Bicinchoninic acid protein assay* (BCA; Sigma Aldrich). Para os experimentos com amostras de linfócitos T CD4 foram utilizados 30 µg de proteínas. A preparação das amostras foi realizada com *Laemmli sample buffer 2x* (Bio-rad), e aquecidas por 10 minutos a 95 °C para desnaturação proteica. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida gradiente (4-12%; Bio-rad) e, após a separação, foram transferidas para membranas de nitrocelulose 0,2 µm (Bio-rad), através do sistema de transferência Trans Blot turbo (Bio-rad). Em seguida, as membranas foram bloqueadas em TBST (TRIS-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween20 0,05%) com leite 5% (Cell Signaling) para redução de ligações inespecíficas, lavadas com TBST e incubadas com os anticorpos primários diluídos em TBST BSA 5% (Sigma Aldrich), durante a noite, à 4 °C sob agitação lenta. Em seguida, as membranas foram lavadas e adicionou-se os anticorpos secundários (anti-rabbit AIM2 Cat. #63660, Cell signaling) em TBST com leite 5% (Cell Signaling), por 2 horas, à temperatura ambiente e agitação lenta. Posteriormente, as membranas foram lavadas por 30 minutos com TBST e adicionou-se o substrato Luminata (Millipore) para a detecção de quimioluminescência, utilizando o

equipamento ChemiDoc™ XRS (Bio-rad) e analisadas com o programa Image Lab 3.0 (Bio-rad). O anticorpo anti-GAPDH (#97166 Cell Signaling) foi usado como controle de carregamento protéico.

3.6 Fracionamento nuclear

Para avaliar a localização de AIM2 em linfócitos T CD4, as células foram coletadas após 36 horas de cultura e realizada a separação de citoplasma e núcleo através de centrifugação à 14.000g por 15 minutos à 4°C, onde o sobrenadante contém as proteínas do citoplasma e o *pellet* as proteínas do núcleo. Após o fracionamento do citoplasma e núcleo, as amostras foram quantificadas pelo método de BCA e colocadas em Laemmli sample buffer 2x (Bio-rad), para posterior desnaturação das proteínas, como descrito acima. Os próximos passos foram similares a um *western blot*. A Lamina B1 foi utilizada como controle de carregamento proteico do núcleo. A β -actina foi utilizada como controle de carregamento proteico do citoplasma.

3.7 Ensaio de Co-Imunoprecipitação

A imunoprecipitação foi realizada utilizando o kit Pierce CO-IP (Thermo Scientific) seguindo o protocolo do fabricante. Neste experimento, foram utilizadas 1×10^7 células por IP. Resumidamente, os anticorpos IgG controle (Cat #2729 Cell signaling) e o anti-AIM2 de camundongo (Cat. #63660, Cell signaling) foram imobilizados usando a resina de acoplamento AminoLink Plus. Quantidades iguais de lisados de células Th17 foram pré-limpos e, subsequentemente, incubados com a resina acoplada ao anticorpo durante a noite à 4 °C. Posteriormente, a resina foi lavada e as proteínas eluídas com tampão de eluição. As amostras imunoprecipitadas foram analisadas quanto à expressão da proteína ROR γ t (Cat. Ab113434 Abcam) e AIM2 por immunoblot, conforme descrito na seção 3.5.

3.8 Imunofluorescência

Para imunofluorescência de células, os linfócitos T obtidos a partir das culturas foram coletados, fixados, permeabilizados em lâminas. Posteriormente,

os preparados foram incubados com anticorpos primários anti-AIM2, anti-CD4 e anti-ROR γ t seguidos da adição de anticorpos secundários conjugados à fluoróforo (AF488, AF594, AF647). Por fim, as lamínulas foram introduzidas nas lâminas juntamente com o meio de montagem *Prolong[®] gold antifade reagent* com DAPI (marcação nuclear). As imagens foram captadas por microscópio confocal *Leica TCS SP5* e analisadas no software *ImageJ*.

3.9 Modelo de colite induzida por transferência adotiva de linfócitos T CD4 para camundongos Rag1^{-/-}

Linfócitos T CD4⁺CD45RB^{high} ($2,5 \times 10^6$) foram isolados por *sorting* a partir de amostras do linfonodo e baço de camundongos WT e AIM2^{-/-} e posteriormente, 5×10^5 células foram injetadas por via intraperitoneal em camundongos Rag1^{-/-}. Em seguida, os camundongos que receberam as células tiveram seu peso monitorado diariamente, e na semana zero e na quarta semana após a transferência foram anestesiados e submetidos ao procedimento de microendoscopia para avaliação de inflamação no colón. Após 8 semanas, os animais foram eutanasiados e procedeu-se com a coleta dos linfonodos mesentéricos (LNM), baço e cólon para análises de citometria de fluxo e H&E.

3.10 Isolamento de células da lâmina própria do colón

Os intestinos removidos dos animais eutanasiados foram abertos longitudinalmente, lavados com PBS para remoção das fezes e cortados em pedaços de cerca de 1 cm. Os pedaços foram incubados com meio RPMI contendo 3% de soro fetal bovino, EDTA e DTT, por 20 minutos à 37°C, sob agitação. Após incubação, os pedaços de intestino foram peneirados e lavados com meio contendo EDTA, para separação dos linfócitos intraepiteliais. A solução resultante das lavagens contém os linfócitos intraepiteliais e foi descartada. Os pedaços restantes foram digeridos com meio contendo liberase (1/250 de uma solução a 25 mg/mL, Roche, Alemanha) e DNase I (SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA), por 25 minutos, à 37 °C sob agitação. Após digestão, a solução foi passada em uma peneira (70 μ m), centrifugada, ressuspendida em PBS + 2% SFB e passada novamente por uma peneira (40 μ m). As células da lâmina própria obtidas foram marcadas com anticorpos monoclonais para análise

da marcação das moléculas de superfície e intracelular, de acordo com a população de células a ser analisada.

3.11 Análise Histológica

Um fragmento de intestino grosso foi retirado, fixado em metacarn (60% Metanol, 30% Clorofórmio e 10% Ácido Acético Glacial) por 24 h à 4°C e, posteriormente, transferido para solução de álcool 70%. O material foi enviado para montagem em blocos de parafina e as lâminas confeccionadas foram coradas com H&E (Hematoxilina & Eosina). As imagens foram obtidas em microscópio Nikon, no aumento de 10 x e 20 x.

3.12 Proliferação de linfócitos e ensaios de células de morte

Linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-} foram diferenciados por 96h e o índice de proliferação foi avaliado usando a diluição de CFSE (*carboxifluoresceína succinimidil éster*) (Sigma), e a apoptose foi avaliada por coloração com Anexina V (BD Biosciences).

3.13 Cultura de macrófagos derivados da medula óssea (BMMs) linfócitos Th17 com agonista de AIM2 (Poly dA:dT)

Para a coleta da medula óssea de camundongos WT e AIM2^{-/-}, inicialmente procedeu-se com a retirada do fêmur utilizando-se 3mL de meio RPMI incompleto. Após a homogeneização das células, 1,5mL dessa suspensão foi adicionada em placas para a aderência das células (Optilux™, BD Biosciences) de dimensões 100 x 20mm. Um volume de 10 mL de meio RPMI 10/30 (30ml de soro bovino fetal, 90mL de LCCM, 3ml de L-glutamina, 3ml de penicilina, e 174mL RPMI incompleto) foi adicionado a essas placas. Essas células foram cultivadas na presença de 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina, à 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Quatro dias depois foram acrescentados mais 10 mL de meio RPMI 10/5 (20mL de soro bovino fetal, 10mL de LCCM, 2mL de L-glutamina, 2mL de penicilina, e 166mL RPMI incompleto) às placas. No sétimo dia de cultivo, as células foram removidas pela lavagem das monocamadas com PBS 1X gelado, e a

concentração celular acertada de acordo com o delineamento experimental. Essas células foram então estimuladas previamente com LPS (50µg) por 4 horas, e, posteriormente, estimuladas por 6 horas com Poly dA:dT (1.5 µg/mL) (agonista de AIM2). Posteriormente, o sobrenadante foi coletado para a dosagem da citocina IL-1β pelo método de ELISA e as células utilizadas para análise de caspase-1 ativa. Linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-} foram diferenciados na presença de Poly dA:dT colocadas em placas estufa de CO₂ à 37°C por 96 horas. Após o período de incubação com o estímulo específico, as células e o sobrenadante foram coletados para posterior análise de caspase-1 ativa e dosagem das citocinas IL-17A e IL-1β.

3.14 Análise *in silico* de dados públicos de ATAC-seq e de sequenciamento de imunoprecipitação de cromatina (ChIP seq)

As análises *in silico* de dados públicos de ATAC-seq e ChIP-seq em linfócitos Th0 e Th17 foram realizadas utilizando o portal Projeto Cistrome (do inglês: Cistrome Project) disponível em <http://cistrome.org/>. O projeto cistrome consiste em um banco de dados públicos de dados genômicos que incluem ATAC-seq e ChIP-seq e dispõe de ferramentas de análises no próprio portal. Para as análises de ATAC-seq e ChIP-seq foi utilizada a ferramenta “Navegador de dados Cistrome” (do inglês: Cistrome Data Browser) disponível em: <http://cistrome.org/db/#/>. Ao acessar a ferramenta, inicialmente foi selecionada a espécie *Mus Musculus* como espécie de interesse para as análises e posteriormente selecionou-se linfócitos Th0 e Th17 como as amostras biológicas para as análises. Em seguida, foi selecionado os fatores de interesse para análise. Nas análises desse estudo foram utilizados como fatores: ATAC-seq (ID: GEO: GSM3505005/CistromeDB: 104388) e ChIP-seq de H3K4me3 (GEO: GSM1004818/CistromeDB: 40128 IRF4 (ID: GEO: GSM1004833/CistromeDB: 40076), STAT3 (GEO: GSM1004866/CistromeDB: 40113), BATF (GEO: GSM1004833/CistromeDB: 40076), c-MAF (GEO: GSM1004799/CistromeDB: 40143) e p-300 (GEO: GSM1004852/CistromeDB: 40123). Após selecionar individualmente os parâmetros anteriores, selecionou-se os resultados, e pesquisou-se o alvo que neste estudo consiste na região promotora de Aim2. Para isso foi utilizada a opção “checar alvo” (Check putative target) onde foi inserido o termo Aim2. Em seguida a coordenada da região cromossômica de

Aim2 foi anotada (chr1:173419603-173466039) e os picos de ATAC-seq ou ChIP-seq foram visualizados através do portal WashU Epigenome Browser (<http://epigenomegateway.wustl.edu/browser/?genome=mm10&hub=http://dc2.cistrome.org/api/datahub/40137&gftk=refGene,full&coordinate=chr1:173319603-173566039>). Na plataforma WashU, a região promotora de Aim2 foi visualizada após pesquisa após inserir a coordenada chr1:173419603-173466039 na opção mouse mm10 (lado direito) – Gene search, SNP search, Region search. Os dados de ATAC-seq utilizados são oriundos do estudo de (SVENSSON et al., 2019) e os de ChIP-seq do estudo de (CIOFANI et al., 2012).

3.15 Análise estatística

As análises dos resultados foram expressas como média \pm desvio padrão (DP) e os seguintes testes estatísticos foram realizados: Teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, ou teste t student seguida. Tais análises foram realizadas com ajuda do software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA) e foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de p igual ou inferior a 0.05.

4. Resultados

4.1 A expressão de AIM2 é regulada positivamente durante a diferenciação de linfócitos Th17

Inicialmente, nosso primeiro objetivo foi avaliar se AIM2 é expresso em diferentes tipos de linfócitos T CD4⁺. De forma interessante, a expressão gênica de AIM2 é aumentada significativamente em linfócitos Th17 e Treg quando comparados aos linfócitos Th1, Th2 e Th0 após 96h de cultura (**Figura 1A**).

Posteriormente, avaliamos a expressão de AIM2 em diferentes tempos durante a diferenciação de linfócitos Th17. Quando comparado aos linfócitos Th0, a expressão de gênica AIM2 está significativamente aumentada 36 e 48 horas após a diferenciação de linfócitos Th17 (**Figura 1B**).

Através da técnica de *western blot*, observamos que a expressão proteica de AIM2 está aumentada 2 dias após a diferenciação de linfócitos Th17 (**Figura 1C**).

Os resultados acima demonstram que a expressão de AIM2 é regulada positivamente nos estágios iniciais da diferenciação de linfócitos Th17.

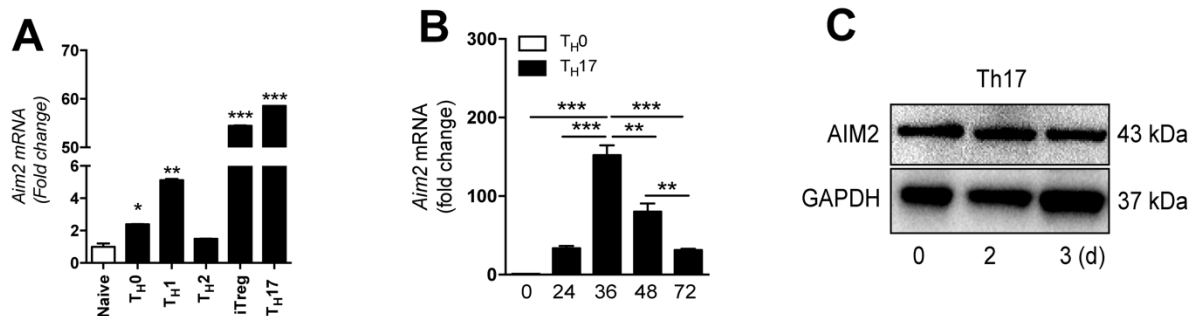


Figura 1 – Expressão de AIM2 em linfócitos Th17; (A) Expressão gênica de *Aim2* em linfócitos T naives, ativados (Th0), Th1, Th2, iTreg e Th17 96 horas após a diferenciação *in vitro*; **(B)** Expressão gênica de *Aim2* em linfócitos Th0 e Th17 nos tempos 24h, 36h, 48h, 72h após a polarização *in vitro*; **(C)** Expressão proteica de AIM2 por western blot (WB) em linfócitos Th17 nos tempos 0, 2 e 3 dias após a polarização *in vitro*. Os valores são expressos como média \pm DP. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p . $N = 3$. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via.

4.2 A expressão de AIM2 está aumentada em linfócitos Th17 patogênicos

Dependendo do microambiente, os linfócitos Th17 podem se diferenciar em linfócitos Th17 clássicos (cTh17) na presença das citocinas TGF- β e IL-6, e desempenhar importantes funções para a manutenção da homeostase nos tecidos de mucosas, ou se diferenciar em linfócitos Th17 patogênicos (pTh17) na presença de TGF- β , IL-6, IL-23 e IL-1 β em condições inflamatórias (STOCKINGER; OMENETTI, 2017).

Nosso próximo objetivo foi avaliar a expressão de AIM2 em cTh17 e pTh17. Para isso, realizamos a diferenciação dos linfócitos e, após 96h de cultura, a expressão de AIM2 foi avaliada por citometria de fluxo. Linfócitos cTh17 produziram em média 4,51% de IL-17A, enquanto pTh17 produzem em média 29,9% de IL-17A (**Figura 2A**). De forma interessante, a frequência e média de intensidade de fluorescência (MFI) de AIM2 é foi de respectivamente 42,9% e 1196 em linfócitos cTh17 e 83,2% e 2696 em linfócitos pTh17 (**Figuras 2B, C, D, E**).

Desta forma, os resultados acima sugerem que linfócitos pTh17 expressam altos níveis de AIM2 em comparação com linfócitos cTh17, o que sugere que a expressão de AIM2 poderia estar relacionada com a patogenicidade de linfócitos Th17.

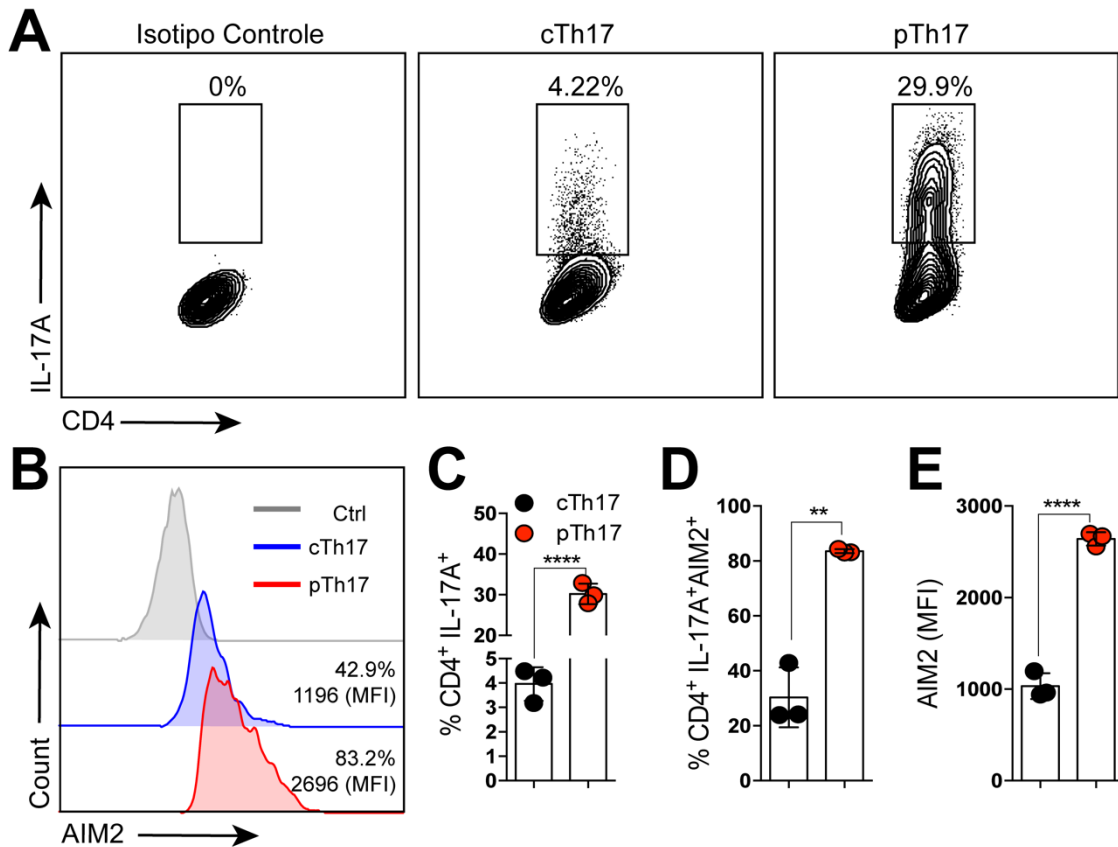


Figura 2 – Expressão de AIM2 em linfócitos Th17 convencionais e patogênicos; (A) Counter plot representando a frequência de células CD4⁺IL-17A⁺ (gate dentro de células viáveis), 36 horas após a diferenciação *in vitro* de linfócitos Th0 e Th17 diferenciados sobre condições polarizantes para o perfil convencional – cTh17 (TGF- β , IL-6) e patogênicos – pTh17 (TGF- β , IL-6, IL-23, IL-1 β); **(B)** Histograma representando a expressão de AIM2 em linfócitos cTh17 e pTh17; **(C, D, E)** Frequência de células IL-17A + e frequência e média de intensidade de fluorescência de AIM2 em linfócitos cTh17 e pTh17. Os valores são expressos como média \pm DP. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p. N = 4. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via.

4.3 O receptor AIM2 é expresso em linfócitos Th17 na mucosa intestinal

Linfócitos Th17 estão presentes em grandes quantidades na mucosa intestinal e são gerados pela presença de bactérias segmentadas filamentosas (SFB), sendo essenciais para a proteção da barreira intestinal (STOCKINGER; OMENETTI, 2017). Desta forma, nosso próximo objetivo foi avaliar a dinâmica de expressão de AIM2 em linfócitos Th17 *in vivo* na mucosa intestinal.

Para avaliar o perfil de expressão de AIM2 em linfócitos Th17 da mucosa intestinal, células do linfonodo mesentérico, lamina própria do intestino delgado e colón foram isoladas e analisadas por citometria de fluxo.

De forma interessante, a frequência e MFI de AIM2 é significativamente aumentada em células IL-17A⁺ em comparação com células IFN γ ⁺ presentes na lamina própria do intestino delgado (**Figuras 3A, D, E**) e colón (**Figuras 3B, D, E**) e nos linfonodos mesentéricos (**Figuras 3C, D, E**).

Não obstante, a expressão de AIM2 é expresso em linfócitos CD4⁺ROR γ t⁺ na lamina própria do intestino delgado (**Figuras 4A, B**) e colón (**Figuras 4C, D**) e nos linfonodos mesentéricos (**Figuras 4E, F**). Além disso, linfócitos CD4⁺T-bet⁺ apresentaram alta expressão de AIM2 na lamina própria do intestino delgado (**Figuras 4A, B**), enquanto que linfócitos Tregs CD4⁺ROR γ t⁺FOXP3⁺ expressam altos níveis de AIM2 na lamina própria do colón (**Figuras 4C, D**). A expressão de AIM2 também está aumentada em linfócitos CD4⁺GATA-3 na lamina própria do intestino delgado e nos linfonodos mesentéricos (**Figuras 4A, B, E, F**).

De forma geral, os resultados acima demonstraram que AIM2 é expresso em células Th17 da mucosa intestinal, mas também por outras subpopulações de linfócitos T CD4⁺ como Th1, Th2 e Treg.

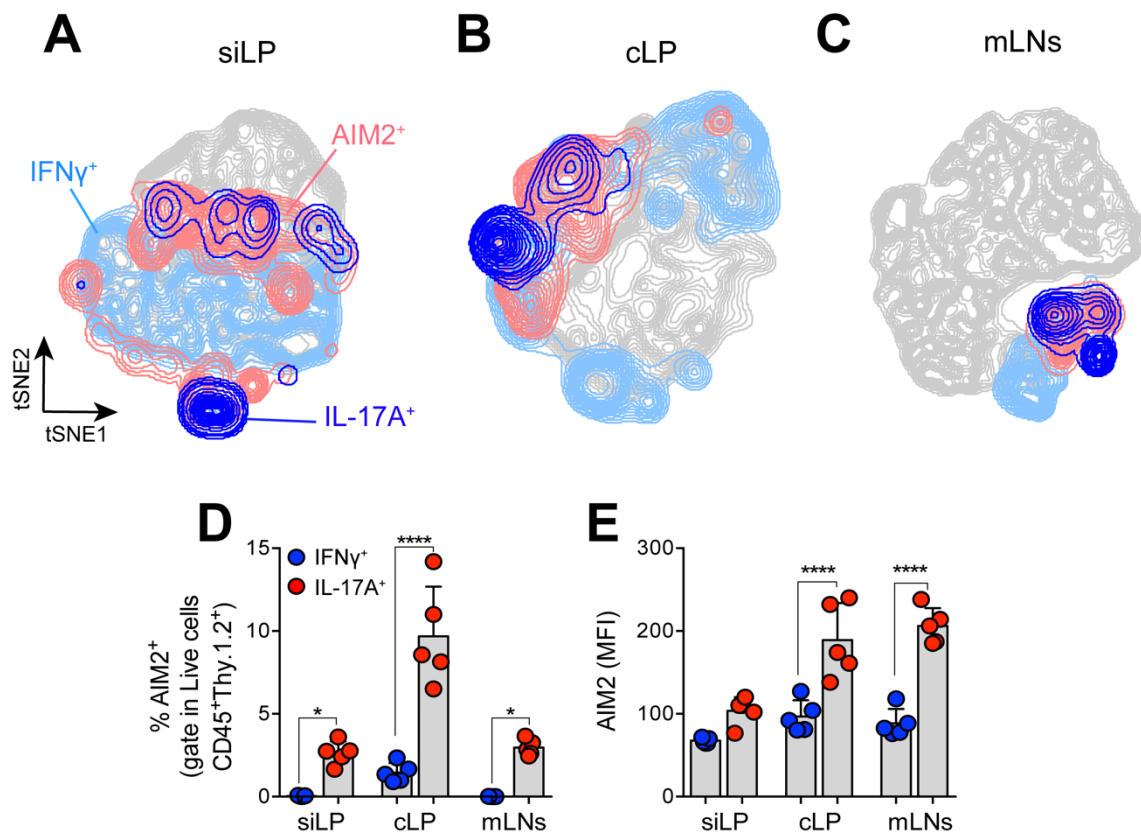


Figura 3 – Expressão de AIM2 em Linfócitos IL-17A⁺ e IFN- γ ⁺ na mucosa intestinal; (A) tSNE representando as populações de células AIM2⁺, IL-17A⁺ e IFN- γ ⁺ na lamina própria do intestino delgado, colón (B) e nos linfonodos mesentéricos (C); (D) Frequência de linfócitos AIM2⁺ em células IL-17A⁺ e IFN- γ ⁺ na lamina própria do intestino delgado, colón e nos linfonodos mesentéricos; (E) MFI de linfócitos AIM2⁺ em células IL-17A⁺ e IFN- γ ⁺ na lamina própria do intestino delgado, colón e nos linfonodos mesentéricos. Os valores são expressos como média \pm DP. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p . $N = 5$. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

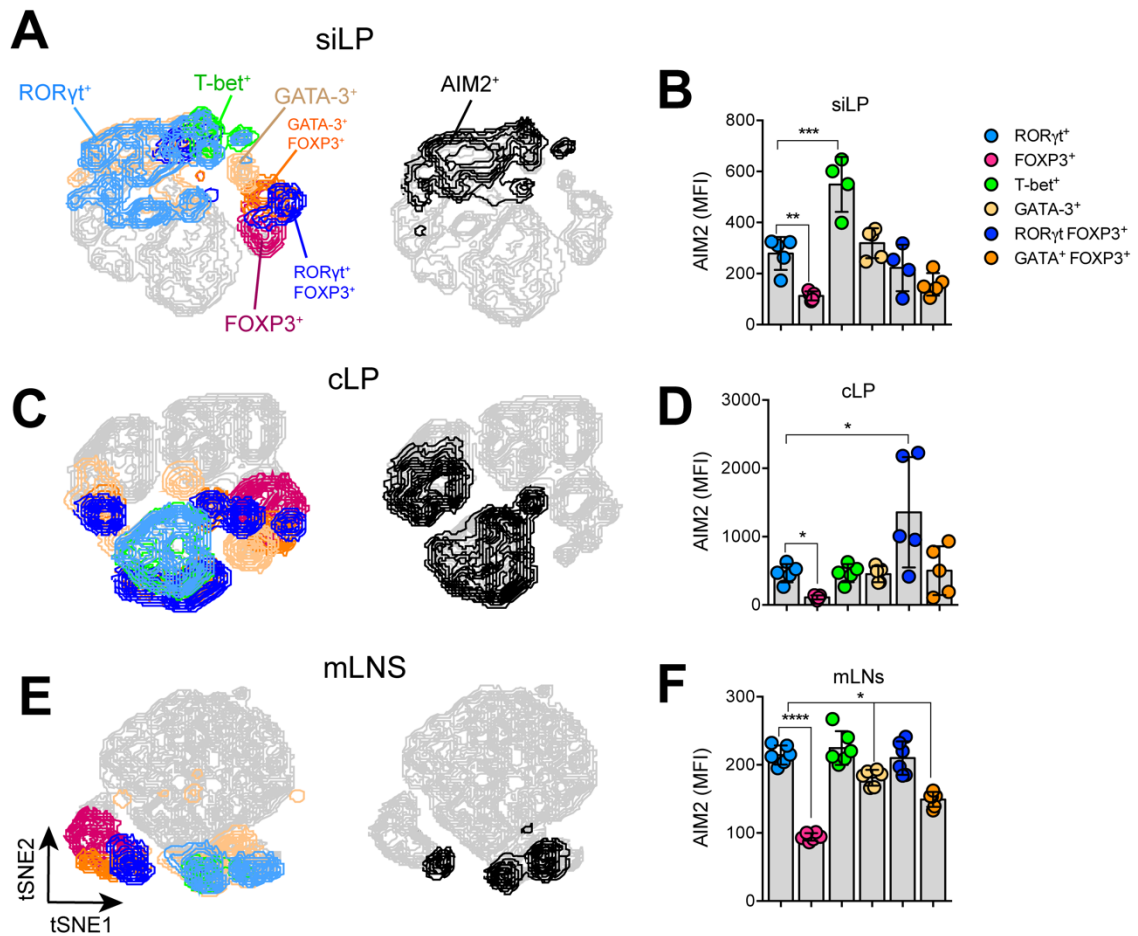


Figura 4 – Expressão de AIM2 em Linfócitos Th17, Th1, Th2 e Treg na mucosa intestinal; (A) tSNE representando as populações de Linfócitos T CD4⁺ RORγt⁺, T-bet⁺, GATA-3⁺, FOXP3⁺, RORγt⁺FOXP3⁺, GATA-3⁺FOXP3⁺ e AIM2⁺ na lamina própria do intestino delgado, colón (C) e nos linfonodos mesentéricos (E); (B, D, F) MFI de AIM2 em populações de Linfócitos T CD4⁺ RORγt⁺, T-bet⁺, GATA-3⁺, FOXP3⁺, RORγt⁺FOXP3⁺, GATA-3⁺FOXP3⁺ na lamina própria do intestino delgado, colón e nos linfonodos mesentéricos. Os valores são expressos como média ± DP. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p. N = 5. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

4.4 A sinalização de TGF- β e IL-6 induz a expressão de AIM2 em linfócitos Th17

Posteriormente, buscamos investigar os fatores que modulam a expressão de AIM2 em linfócitos Th17. Desta forma, avaliamos se a ativação de TCR, co-estimulação ou citocinas TGF- β e IL-6, poderiam regular a expressão de AIM2 em linfócitos Th17. Para testar essa hipótese realizamos culturas de linfócitos T CD4⁺ em diferentes condições e avaliamos a expressão gênica de *Aim2*.

O estímulo de linfócitos T CD4⁺ com anti-CD3/anti-CD28 não alterou a expressão de AIM2, enquanto linfócitos T CD4⁺ ativados com anti-CD3/CD28 apresentam alta expressão de AIM2 após estímulo com TGF- β . Linfócitos T CD4⁺ ativados com anti-CD3/CD28 e estimulados apenas com IL-6 expressam baixos níveis de mRNA de AIM2. No entanto, linfócitos T CD4⁺ ativados com anti-CD3/CD28 e estimulados com TGF- β e IL-6 expressam altos níveis de mRNA de AIM2 quando comparado as demais condições (**Figura 5A**).

De forma interessante, linfócitos Th17 diferenciados na presença de 20 ng/mL de IL-6 aumentam significativamente a expressão gênica de AIM2 quando estimulados com 2,5 ng/mL e 10 ng/mL de TGF- β e na concentração de 10 ng/mL de TGF- β aumentam a expressão gênica de *Rorc* e *Il17a* (**Figura 5B, D**). Não obstante, linfócitos Th17 diferenciados na presença de 2,5 ng/mL TGF- β aumentam significativamente a expressão gênica de AIM2 quando estimulados com 10, 20 e 50 ng/mL de IL-6 e nas concentrações de 20, e 50 ng/mL de IL-6 aumentam a expressão gênica de *Rorc*, *Stat3* e *Il17a* (**Figura 5C, D**).

Em suma, os resultados acima sugerem que a expressão de AIM2 parece ser regulada através das vias de sinalização de TGF- β e IL-6. Contudo, não existe evidências na literatura de que essas citocinas induzam a expressão de AIM2 em outros subtipos celulares, uma vez que a expressão de AIM2 é induzida por IFN- γ e nas condições de diferenciação *in vitro* de Th17, a sinalização de IFN- γ , IL-4 e IL-2 é bloqueada para que não ocorra alterações na diferenciação.

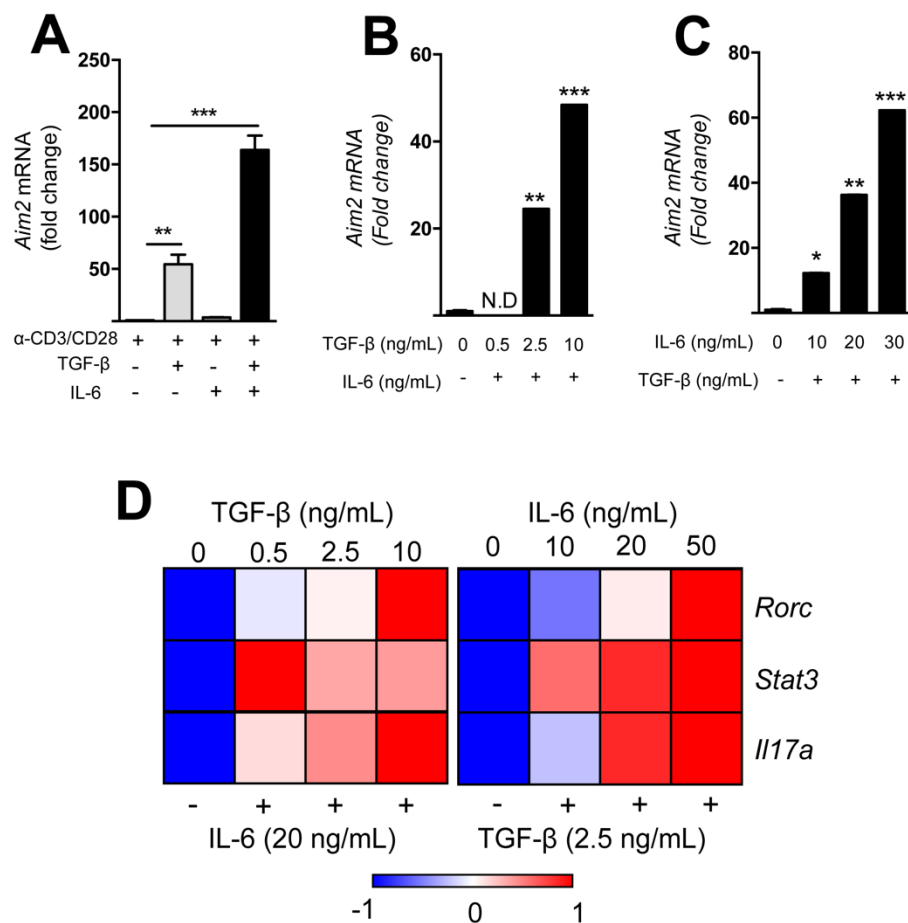


Figura 5 – Importância de TGF-β e IL-6 na expressão de AIM2 em Linfócitos Th17; (A) Expressão gênica de *Aim2* em linfócitos T CD4⁺ estimulados com anti-CD3/CD28, TGF-β, IL-6 ou TGF-β + IL-6; **(B)** Expressão gênica de *Aim2* em linfócitos Th17 diferenciados *in vitro* na presença de 20 ng/mL de IL-6 e 0, 0.5, 2.5 e 10 ng/mL de TGF-β; **(C)** Expressão gênica de *Aim2* em linfócitos Th17 diferenciados *in vitro* na presença de 2.5 ng/mL de TGF-β e 0, 10, 20 e 30 ng/mL de IL-6; **(D)** Expressão gênica de *Rorc*, *Stat3* e *Il17a* em linfócitos Th17 diferenciados *in vitro* na presença de presença de 20 ng/mL de IL-6 e 0, 0.5, 2.5 e 10 ng/mL de TGF-β ou de 2.5 ng/mL de TGF-β e 0, 10, 20 e 30 ng/mL de IL-6. Os valores são expressos como média ± DP. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p . $N = 3$. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

4.5 Aumento na acessibilidade da cromatina na região promotora de *Aim2* em linfócitos Th17

A ativação transcricional em células eucarióticas ocorre após a interrupção da organização do nucleossomo permitindo a entrada e atividade de fatores de transcrição em regiões promotoras, assim como intensificadores e silenciadores. Não obstante, para que essas moléculas tenham acesso a regiões promotoras de um gene é necessária abertura dos sítios genômicos tornando a cromatina acessível para a regulação transcricional do gene (TSOMPANA & BUCK, 2014).

Nesse sentido, nosso próximo objetivo foi avaliar o perfil de acessibilidade da cromatina no *locus* de *Aim2* em linfócitos Th17. Para isso, foram realizadas análises *in silico* de ATAC-seq (do inglês: *Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing*) de linfócitos Th0 e Th17. Os dados obtidos são provenientes do estudo de SVENSSON MN, et al., (2019) e estão depositados na plataforma Cistrome Project (ID: GEO: GSM3505005/CistromeDB: 104388).

De forma interessante, observamos que a região promotora de *Aim2* possui vários picos de ATAC-seq em linfócitos Th17 quando comparado à linfócitos Th0 (**Figura 6A**).

A acessibilidade da cromatina no *locus* de um gene está associada com o remodelamento da cromatina por metiltransferases como H3K4me3 que promove a metilação do quarto resíduo de lisina da histona H3. Tal atividade, torna o DNA na cromatina acessível a fatores de transcrição e permite a transcrição de genes nas células (COLLINS et al., 2019).

Através de análises *in silico* utilizando dados públicos de sequenciamento de imunoprecipitação da cromatina (ChIP-seq) oriundos do estudo de CIOFANI et al., (2012), observamos vários picos de ligação de H3K4me3 na região promotora de *Aim2* em linfócitos Th17 em comparação com os linfócitos Th0 (**Figura 6B**).

Desta forma, os resultados acima sugerem que a região promotora de *Aim2* em linfócitos Th17 está aberta na cromatina e acessível para a ligação de fatores de transcrição.

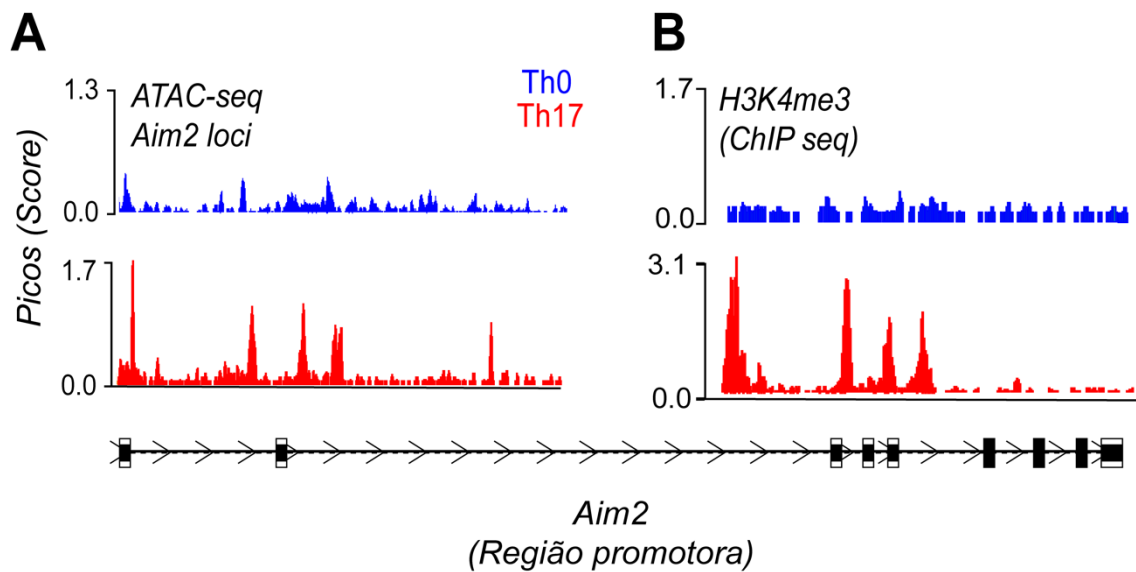


Figura 6 – Análise *in silico* de ATAC-seq e ChIP-seq de H3K4me3 em linfócitos Th0 e Th17; (A) Análise de ATAC-seq da região promotora de *Aim2* em linfócitos Th17 (ID: GEO: GSM3505005/CistromeDB: 104388); **(B)** Análise de ChIP de H3K4me3 em linfócitos Th0 e Th17 (GEO: GSM1004818/CistromeDB: 40128). As análises foram realizadas utilizando a plataforma Cistrome Project – ferramenta Cistrome Data Browser. Disponível em: <http://cistrome.org/db/#/>

4.6 A região promotora de *Aim2* está ocupada por diferentes fatores de transcrição relacionados a diferenciação de linfócitos Th17.

Os resultados da figura anterior demonstraram que a região promotora de *Aim2* está aberta e acessível para a ligação de fatores de transcrição. Não obstante, os resultados da figura 5 sugerem que a expressão de AIM2 em linfócitos é regulada pela sinalização de TGF- β e IL-6.

Nosso próximo objetivo foi investigar se os fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de linfócitos Th17 se ligam na região promotora de *Aim2* em linfócitos Th17. Para isso, utilizamos dados públicos de ChIP seq de IRF4, STAT3, BATF, c-MAF e p300 em linfócitos Th17 oriundos do estudo de CIOFANI et al., (2012).

De forma interessante, as análises de ChIP-seq demonstraram que os fatores de transcrição IRF4, STAT3, BATF, c-MAF e p-300 estão ligados na região promotora de *Aim2* em linfócitos Th17 quando comparado aos linfócitos Th0 (**Figuras 7A**).

Em suma, esses resultados sugerem que a região promotora de *Aim2* é ocupada por diferentes tipos de fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de linfócitos Th17 e que os mesmos possam regular a expressão de *Aim2* nessa célula.

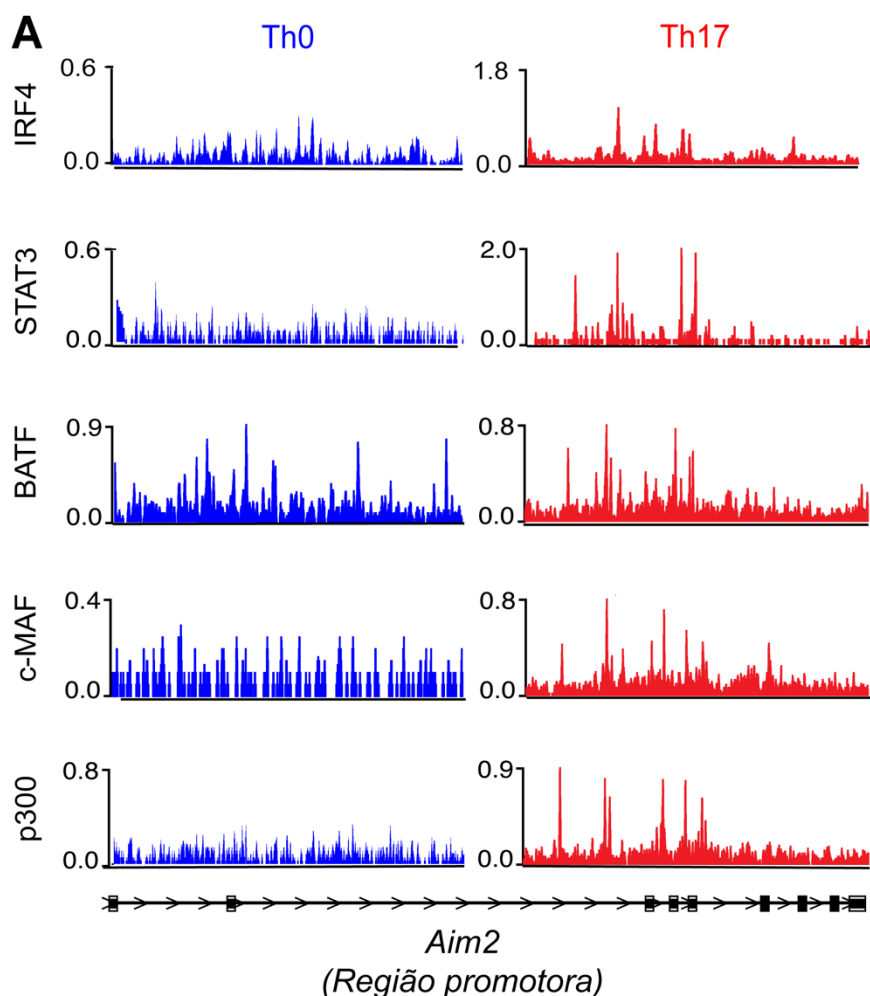


Figura 7 – Análise *in silico* de ChIP-seq de IRF4, STAT3, BATF, MAF, p-300 em linfócitos Th0 e Th17; (A) Análise de ChIP seq dos fatores de transcrição IRF4 (ID: GEO: GSM1004833/CistromeDB: 40076), STAT3 (GEO: GSM1004866/CistromeDB: 40113), BATF (GEO: GSM1004833/CistromeDB: 40076), c-MAF (GEO: GSM1004799/CistromeDB: 40143) e p-300 (GEO: GSM1004852/CistromeDB: 40123) na região promotora de *Aim2* em linfócitos Th0 e Th17. As análises foram realizadas utilizando a plataforma Cistrome Project – ferramenta Cistrome Data Browser. Disponível em: <http://cistrome.org/db/#/>.

4.7 AIM2 atua como um regulador positivo na diferenciação de linfócitos Th17 e produção de IL-17A

Os resultados apresentados nas figuras anteriores demonstraram que AIM2 é expresso em linfócitos Th17. Desta forma, nosso próximo objetivo foi investigar se ausência de AIM2 em linfócitos T CD4⁺ poderia alterar a diferenciação para o perfil Th17.

Inicialmente, isolamos linfócitos T CD4⁺ naíves do baço e linfonodos de camundongos WT e AIM2^{-/-}, e as células foram colocadas em cultura nas condições polarizantes para a diferenciação de linfócitos cTh17 e pTh17. De forma interessante, a frequência de células CD4⁺IL-17A⁺ WT é de 12% (Th17c) e 23,3% (Th17p) e 7,06% (cTh17) e 12,8% (pTh17) em AIM2^{-/-} (**Figura 8A, C**). Além disso, também foi detectado níveis reduzidos de IL-17A no sobrenadante das culturas de linfócitos cTh17 e pTh17 deficientes de AIM2, quando comparado aos linfócitos cTh17 e pTh17 WT (**Figura 8B**) e níveis reduzidos de mRNA de IL-17a em linfócitos Th17 AIM2^{-/-} quando comparado aos WT (**Figura 8D**), contudo, não observamos diferenças nos níveis de mRNA de IL-22 entre linfócitos Th17 proveniente de animais WT e AIM2^{-/-} (**Figura 8E**).

Sendo assim, estes resultados demonstram que a deficiência de AIM2 prejudica a produção de IL-17A por linfócitos Th17, sugerindo que AIM2 atua como um regulador positivo na diferenciação de linfócitos Th17.

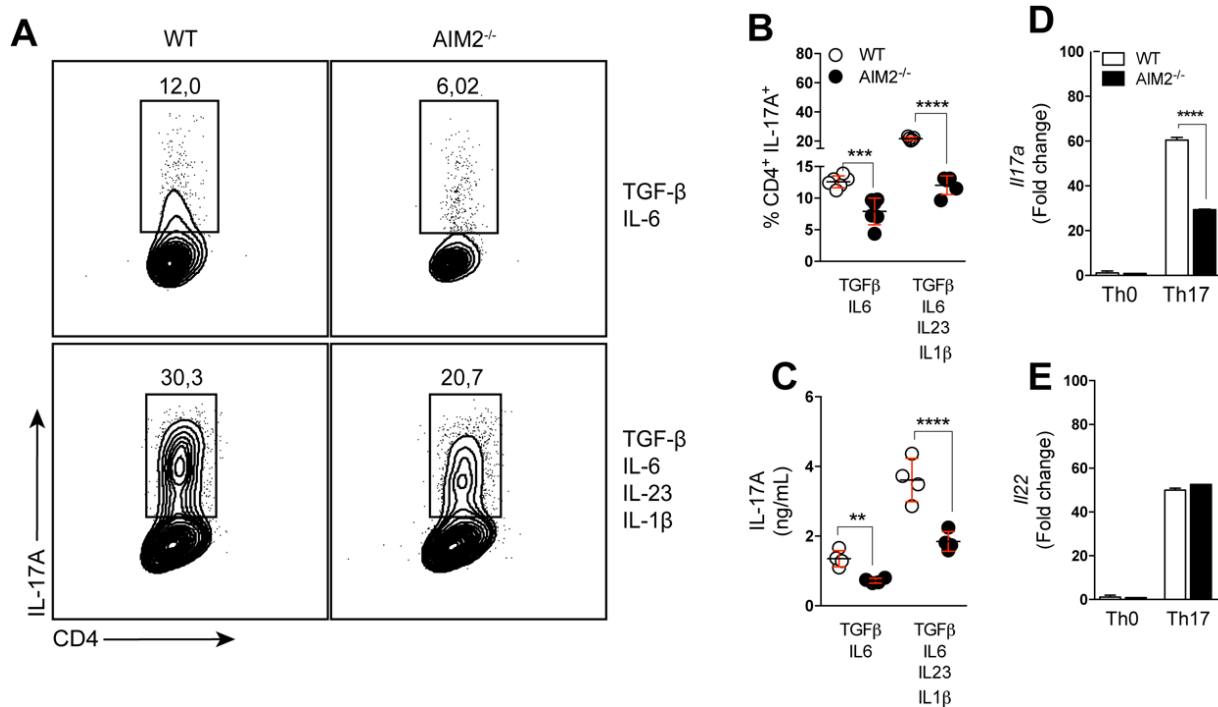


Figura 8 – Diferenciação *in vitro* de Linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}; (A) *Counter plot* representando a frequência de células CD4⁺IL-17A⁺ (*gate* dentro de células viáveis), 96 horas após a diferenciação *in vitro* de linfócitos Th17 diferenciados sobre condições polarizantes para o perfil convencional (TGF-β, IL-6) e patogênicos (TGF-β, IL-6, IL-23, IL-1β) provenientes de linfócitos T CD4⁺ naïves isoladas por *sorting* a partir de amostras de linfonodos e baço de camundongos WT e AIM2^{-/-}; **(B)** Frequência de células CD4⁺IL-17A⁺ WT e AIM2^{-/-} (*gate* dentro de células viáveis); **(C)** Níveis proteicos de IL-17A no sobrenadante das culturas de linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}; **(D, E)** Expressão gênica de *Il17a* e *Il22* em linfócitos Th17 diferenciados *in vitro* WT e AIM2^{-/-}. Os valores são expressos como média ± DP. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p . $N = 4-6$. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via.

4.8 A deficiência de AIM2 não altera a proliferação e viabilidade de linfócitos Th17

Os resultados apresentados na figura anterior demonstraram que linfócitos Th17 deficientes de AIM2 produzem menos IL-17A em comparação com linfócitos Th17 WT. Desta forma, nosso próximo objetivo foi avaliar se a redução na produção de IL-17A por linfócitos Th17 deficientes de AIM2 poderia estar associada com uma menor capacidade de proliferação ou por alterações na viabilidade destas células.

Inicialmente, avaliamos a capacidade de proliferação de linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-} através do ensaio de proliferação com CFSE. De forma interessante, linfócitos Th17 AIM2^{-/-} proliferam de forma similar aos linfócitos Th17 WT (**Figura 9A, C**).

Posteriormente, foi avaliado a viabilidade dos linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-} através da marcação de anexina-V. A anexina V é comumente utilizada para detectar células apoptóticas devido sua capacidade de se ligar à fosfatidilserina, um marcador de apoptose quando está na camada externa da membrana plasmática. De acordo com os resultados apresentados nas **figuras 9B, D**, não existem diferenças na frequência de expressão de anexina V por linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}. Não obstante, a média da frequência de linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-} positivos para anexina V é de respectivamente 1,2% e 1,3%. Sendo assim, estes resultados demonstram que não houve alterações na viabilidade dos linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}.

Em suma, nossos resultados demonstraram que menor produção de IL-17A/F por linfócitos Th17 deficientes de AIM2 não está associada com alterações na proliferação ou viabilidade destas células. Desta forma, estes resultados sugerem que AIM2 regula positivamente a diferenciação de linfócitos Th17 através de mecanismos intracelulares que contribuem para a diferenciação destas células.

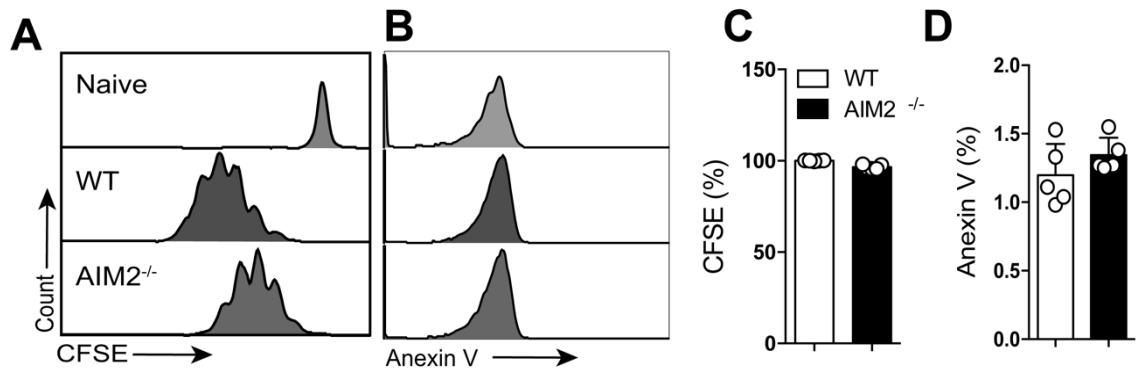


Figura 9 – Proliferação e viabilidade de Linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}; (A, C) Histograma e frequência representando a positividade de linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-} para CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*); **(B, D)** Histograma e frequência representando a positividade de linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-} para Anexina – V. Os valores são expressos como média ± DP. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p . $N = 5$. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

4.9 A deficiência de AIM2 não altera a diferenciação *in vitro* de linfócitos Th1, Th2 e iTreg

Posteriormente, avaliamos se a deficiência de AIM2 poderia alterar a diferenciação de linfócitos Th1, Th2 e células T reguladoras induzidas (iTreg). Para isso, isolamos linfócitos T CD4⁺ naïves do baço e linfonodos de camundongos WT e AIM2^{-/-} e as células foram colocadas em cultura nas condições polarizantes para a diferenciação de linfócitos Th1 e iTreg.

De acordo com nossos resultados, linfócitos Th1 deficientes de AIM2 produzem níveis semelhantes de IFN- γ quando comparado aos linfócitos Th1 WT (**Figura 10A, B**). De forma semelhante, linfócitos Th2 provenientes de animais WT e AIM2^{-/-} produzem níveis similares de IL-4 (**Figura 10A, C**) e iTreg AIM2^{-/-} expressam níveis similares do fator de transcrição FOXP3 quando comparadas as iTreg WT (**Figura 10A, D**).

Desta forma, nossos resultados sugerem que a deficiência de AIM2 não altera a diferenciação de linfócitos Th1, Th2 e iTreg *in vitro*.

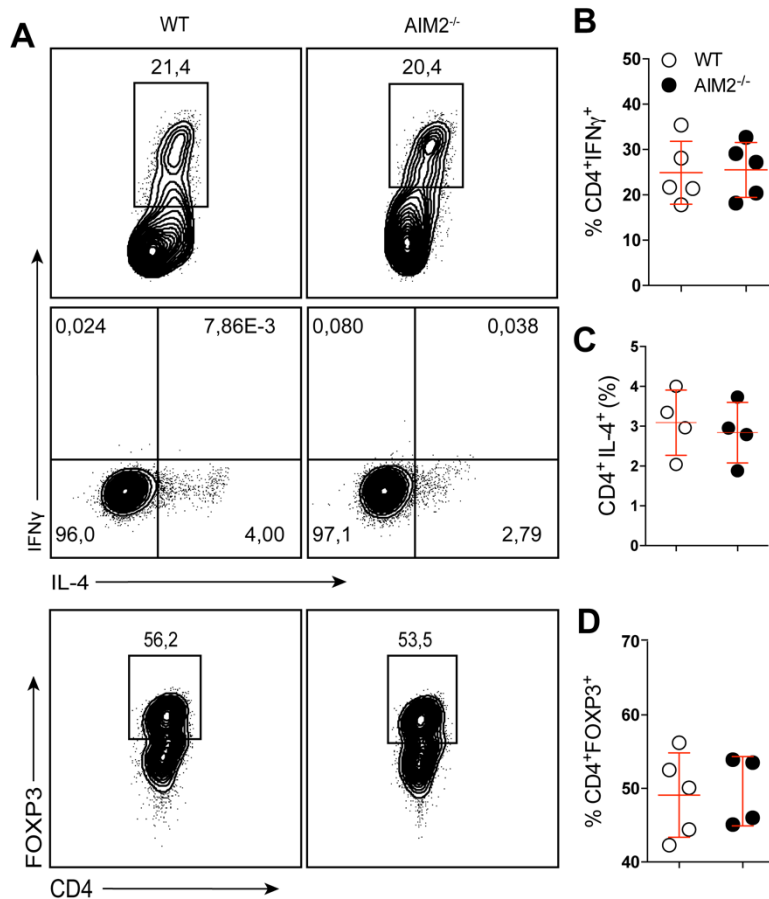


Figura 10 – Diferenciação *in vitro* de Linfócitos Th1, Th2 e Treg WT e AIM2^{-/-}; (A, B, C) *Counter plot* representando a frequência de células CD4⁺IFN-γ⁺ (*gate* dentro de células viáveis), 96 horas após a diferenciação *in vitro* sob condições polarizantes para o perfil Th1 (IL-12), provenientes de linfócitos T CD4⁺ naíves isoladas por *sorting* a partir de amostras de linfonodos e baço de camundongos WT e AIM2^{-/-}; *counter plot* representando a frequência de células CD4⁺IL-4⁺ (*gate* dentro de células viáveis), 96 horas após a diferenciação *in vitro* sob condições polarizantes para o perfil Th2 (IL-4), provenientes de linfócitos T CD4⁺ naíves isoladas por *sorting* a partir de amostras de linfonodos e baço de camundongos WT e AIM2^{-/-} (A, C) *Counter plot* representando a frequência de células CD4⁺FOXP3⁺ (*gate* dentro de células viáveis), 96 horas após a diferenciação *in vitro* sob condições polarizantes para o perfil iTreg (TGF-β), provenientes de linfócitos T CD4⁺ naíves isoladas por *sorting* a partir de amostras de linfonodos e baço de camundongos WT e AIM2^{-/-}. Os valores são expressos como média ± DP. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando p < 0,05, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p. N = 4. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey

4.10 Redução da produção de IL-17A por linfócitos T CD4⁺ deficientes de AIM2^{-/-} *in vivo*

Nossos resultados demonstraram até o momento que a diferenciação *in vitro* de linfócitos Th17 é comprometida na ausência de AIM2. Sendo assim, nosso próximo objetivo foi avaliar se a ausência de AIM2 também altera a diferenciação de linfócitos Th17 *in vivo*.

Inicialmente, isolamos leucócitos totais do baço e linfonodos mesentéricos (LNM) de camundongos WT e AIM2^{-/-} e estas células foram reestimuladas com PMA, ionomicina e brefeldina-A por 4 horas para avaliar a produção das citocinas IL-17A e IFN γ . De forma interessante, os linfócitos T CD4⁺ provenientes do baço e LNM de camundongos AIM2^{-/-} produziram significativamente menos IL-17A quando comparado aos camundongos WT (**Figura 11A, B, C**). Ademais, a frequência de células CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ é similar no baço e LNM de camundongos WT e AIM2^{-/-} sugerindo que a deficiência de AIM2 não altera produção destas citocinas por linfócitos Th1 (**Figura 11A, D, E**).

Para confirmar o envolvimento de AIM2 na regulação da produção de IL-17A *in vivo*, esplenócitos e células da lâmina própria do intestino delgado e colón provenientes de camundongos WT e AIM2^{-/-} foram isoladas e reestimuladas *in vitro* com anti-CD3 e anti-CD28 por 24 horas e posteriormente os níveis de IL-17A foram quantificados no sobrenadante. De forma interessante, os níveis de IL-17A detectados foram significativamente menores na ausência de AIM2 das culturas de esplenócitos (**Figura 11F**) e de leucócitos da lâmina própria (**Figura 11G**) quando comparado ao grupo WT.

Os dados acima demonstraram que a produção de IL-17A por linfócitos T CD4⁺ presentes no baço e LNM é reduzida na ausência de AIM2. Para confirmar esta hipótese, linfócitos T efetores (CD4⁺CD25⁻CD44⁺) foram isolados por *sorting* do baço e LNM de camundongos WT e AIM2^{-/-} e, posteriormente, foram reestimulados com anti-CD3/CD28 para detecção de IL-17A e expressão gênica de genes relacionados à diferenciação para o perfil Th17. De forma interessante, a frequência de linfócitos T CD4⁺CD25⁻CD44^{high} produtores de IL-17A isolados de camundongos AIM2^{-/-} é significativamente menor comparado aos WT (**Figura 12A, B**) e a deficiência de AIM2 nestas células está associada com níveis reduzidos de mRNA dos genes *Rorc*, *Stat3* e *IL-17a* em comparação aos WT (**Figura 12, D, E**).

Em conjunto, estes resultados demonstram que a expressão intrínseca de AIM2 regula a diferenciação de linfócitos Th17 *in vivo* em condições de homeostase.

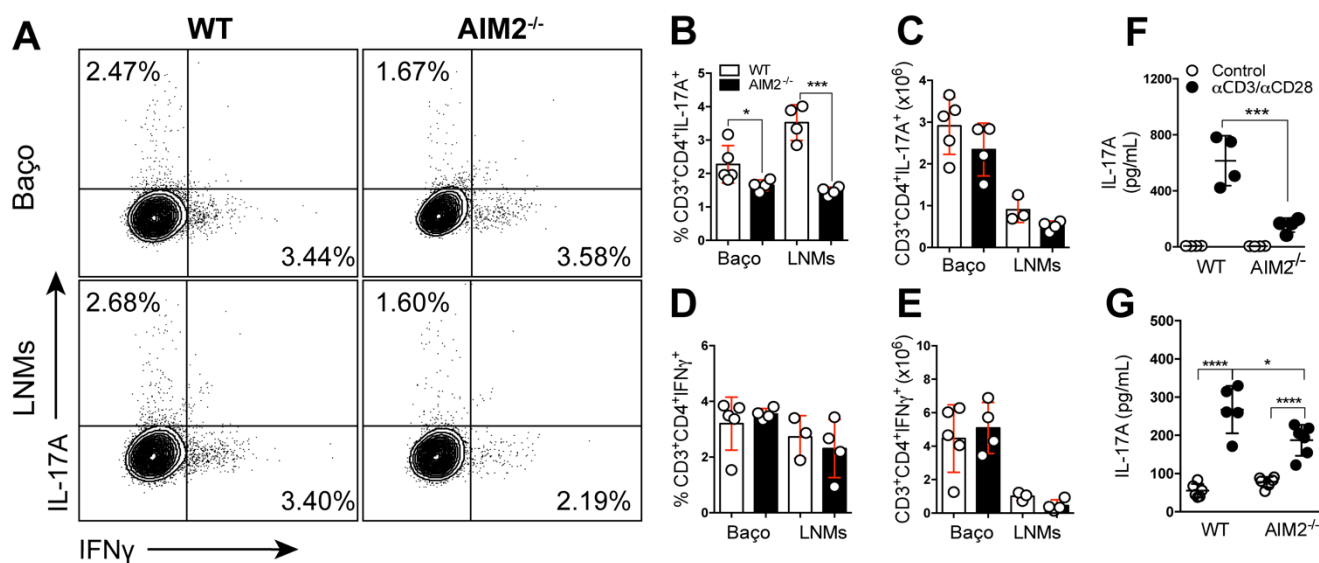


Figura 11 – Produção de IL-17A *in vivo* por Linfócitos CD4⁺ WT e AIM2^{-/-}; (A) *Counter plot* representando a frequência de células CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺ (*gate* dentro de células viáveis) em amostras de baço e linfonodos mesentéricos de camundongos WT e AIM2^{-/-}; (B) Frequência de células e número absoluto de linfócitos CD3⁺CD4⁺IL-17A⁺ em amostras de baço e linfonodos mesentéricos provenientes de camundongos WT e AIM2^{-/-}; (D, E) Frequência de células e número absoluto de linfócitos CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ em amostras de baço e linfonodos mesentéricos provenientes de camundongos WT e AIM2^{-/-}; (F, G) Níveis proteicos de IL-17A no sobrenadante das culturas de leucócitos isolados do baço e da lâmina própria intestinal (intestino delgado e cólon) de camundongos WT e AIM2^{-/-} e estimulados por 24 horas com anti-CD3/CD28. Os valores são expressos como média \pm DP. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p . N = 4-6. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via.

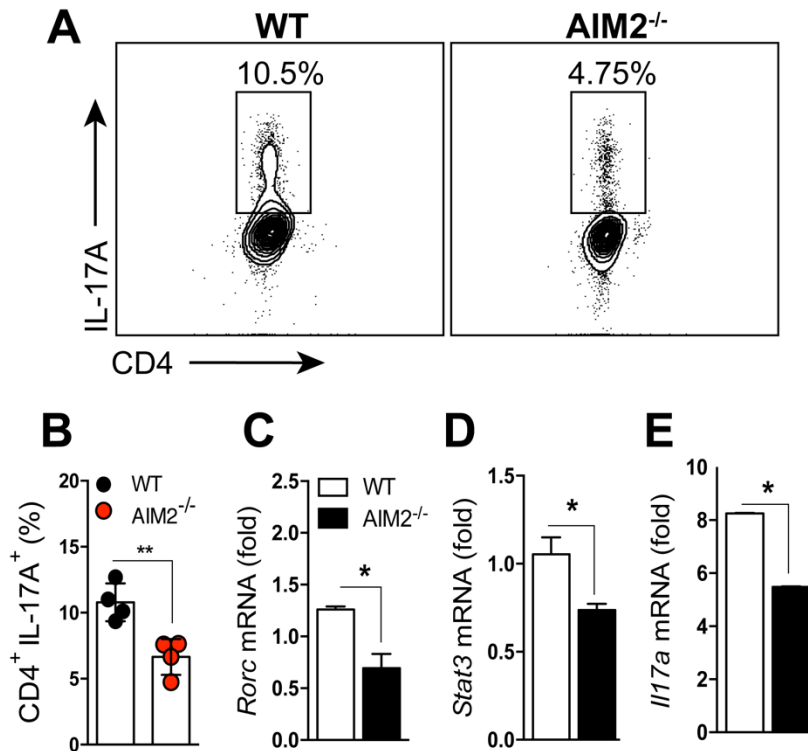


Figura 12 – Produção de IL-17A *ex vivo* por Linfócitos T CD4⁺ efetores (CD4⁺CD25⁻CD44^{high}) WT e AIM2^{-/-}; (A) *Counter plot* representando a frequência de células CD4⁺IL-17A⁺ (*gate* dentro de células viáveis) após *sorting* de células CD4⁺CD25⁻CD44^{high} provenientes de amostras de baço e linfonodos de camundongos WT e AIM2^{-/-}. As células foram estimuladas com anti-CD3/CD28 por 24 horas; (B) Frequência de células CD4⁺IL-17A⁺ (CD4⁺CD25⁻CD44^{high}) provenientes de amostras de baço e linfonodos de camundongos WT e AIM2^{-/-} após 24 horas de estímulo com anti-CD3/28; (C, D, E) Níveis de mRNA de *Rorc*, *Stat3* e *Il17a* em células CD4⁺CD25⁻CD44^{high} WT e AIM2^{-/-} após 24 horas de estímulo com anti-CD3/CD28. Os valores são expressos como média ± DP. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p . $N = 4$. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

4.11 Linfócitos T CD4⁺ deficientes de AIM2 produzem menos IL-17A e IFN- γ e protegem contra colite induzida pela transferência de linfócitos T em camundongos Rag1^{-/-}

Para determinar se a ausência de AIM2 em células T CD4⁺ pode impactar na diferenciação de células produtoras de IL-17A⁺ *in vivo*, linfócitos T CD4⁺ naïves (CD4⁺CD45RB^{high}) foram isolados por *sorting* de camundongos WT e AIM2^{-/-} e transferidos para camundongos Rag1^{-/-} e, posteriormente, o desenvolvimento de colite foi monitorado diariamente nos camundongos receptores.

Camundongos Rag1^{-/-} que receberam linfócitos T CD4⁺ WT desenvolveram colite, conforme indicado pela perda de peso corporal, e apresentaram comprimento do cólon diminuído. A análise histológica também mostra um aumento da infiltração inflamatória no tecido do cólon. No entanto, camundongos Rag1^{-/-} que receberam linfócitos T CD4⁺ AIM2^{-/-} não perderam peso, também têm maior comprimento do cólon e menos inflamação do cólon, o que indica que a transferência de células T CD4⁺ deficientes em AIM2 falha em induzir colite em Rag1^{-/-} (**Figura 13A, B, C, D**). Análises de microendoscopia dos camundongos receptores demonstraram que os camundongos Rag1^{-/-} que receberam linfócitos T CD4⁺ AIM2^{-/-} não apresentaram sinais de granulosidade, fibrina e fezes em estado diarreico. Em contrapartida, camundongos Rag1^{-/-} que receberam linfócitos T CD4⁺ WT apresentaram sinais de granulosidade, presença de fibrina, pouca vascularização e fezes diarreica, sendo estes, sinais de inflamação no colón (**Figura 13E**). Desta forma, nossos resultados sugerem que em comparação aos linfócitos T CD4⁺ WT, linfócitos T CD4⁺ deficientes de AIM2 falham em induzir o desenvolvimento em camundongos Rag1^{-/-}.

Em seguida, nosso próximo passo foi investigar se a falha em induzir colite observada após a transferência de linfócitos T CD4⁺ deficientes de AIM2 estava associada com alterações na frequência de linfócitos TCR β ⁺CD4⁺ nos camundongos receptores. Para isso, células do baço, LNM e da lâmina própria do colón foram isoladas para quantificação da frequência de linfócitos TCR- β ⁺CD4⁺ (estratégia de *gate*) (**Figura 14A, B, C, D**). Nossos resultados demonstram que a frequência e número absoluto de linfócitos TCR β ⁺CD4⁺ no baço, LNM e lâmina própria do colón é semelhante entre os receptores que receberam linfócitos T CD4⁺ WT e AIM2^{-/-} (**Figura 13F, G**).

Posteriormente, avaliamos a produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺ WT e AIM2^{-/-} CD4 no LNM e lâmina própria do colón de camundongos Rag1^{-/-} após a transferência. De forma interessante, a frequência e o número absoluto de células TCR-β⁺CD4⁺IL17A⁺, e TCR-β⁺CD4⁺IL17A⁺IFN-γ⁺ está significativamente reduzida em camundongos Rag1^{-/-} que receberam células T CD4⁺ deficientes de AIM2 em comparação com Rag1^{-/-} que receberam linfócitos T CD4⁺ WT (**Figuras 15A, B, C, F, G**). A frequência de células TCR-β⁺CD4⁺IFN-γ⁺ apresentou-se aumentada apenas no LNM, contudo, o número absoluto destas células está diminuído (**Figura 15D, E**).

Também observamos redução na frequência e número absoluto de linfócitos TCR-β⁺CD4⁺RORγt⁺ no LNM e lâmina própria do colón em camundongos Rag1^{-/-} que receberam células T CD4 deficientes em AIM2 em comparação com Rag1^{-/-} que receberam linfócitos T CD4⁺ WT (**Figura 16A, B, C**). Adicionalmente, frequência e número absoluto de linfócitos TCR-β⁺CD4⁺FOXP3⁺ e frequência e número absoluto de linfócitos TCR-β⁺CD4⁺RORγt⁺FOXP3⁺ também se apresentaram reduzidos no LNM e lâmina própria do colón em camundongos Rag1^{-/-} que receberam células T CD4⁺ deficientes em AIM2 em comparação com Rag1^{-/-} que receberam linfócitos T CD4⁺ WT (**Figura 16A, D, E, F, G**).

Tomados em conjunto, esses resultados demonstraram que a ausência de AIM2 em células T CD4⁺ protege contra colite induzida por transferência adotiva de linfócitos T em Rag1^{-/-} e isso está associado redução na frequência de linfócitos Th17 produtores de IL-17A e IFN-γ no LNM e lâmina própria, o que indica que a expressão de AIM2 em linfócitos T CD4 promove a diferenciação das células Th17 *in vivo* e indução do desenvolvimento de inflamação intestinal.

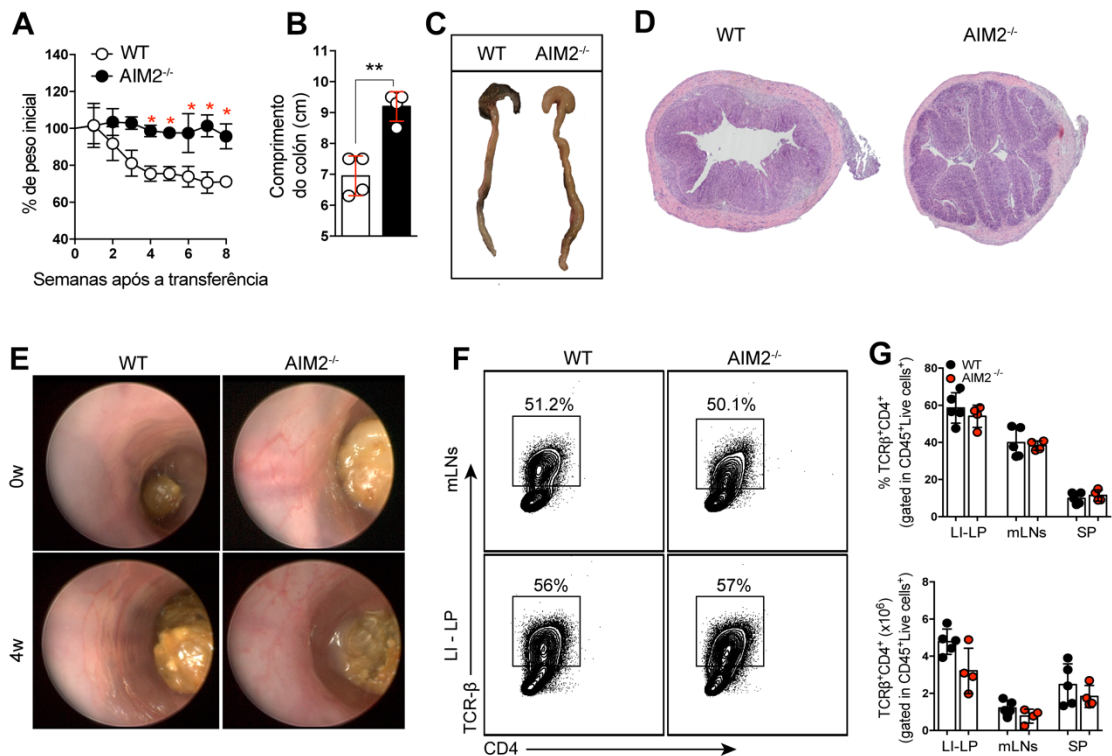


Figura 13 – Colite induzida por transferência de Linfócitos CD4⁺ WT e AIM2^{-/-} em camundongos Rag1^{-/-}; (A) Frequência do peso inicial de camundongos Rag1^{-/-} 0, 2, 4, 6, 8 semanas após a transferência de linfócitos T CD4⁺CD45RB^{high} isolados de camundongos WT e AIM2^{-/-}; **(B, C)** Comprimento do cólon de camundongos Rag1^{-/-} 8 semanas após a transferência de linfócitos T CD4⁺CD45RB^{high} isolados de camundongos WT e AIM2^{-/-}; **(D)** Histologia do cólon de camundongos Rag1^{-/-} 4 semanas após a transferência de linfócitos T CD4⁺CD45RB^{high} isolados de camundongos WT e AIM2^{-/-}; **(E)** Endoscopia do cólon de camundongos Rag1^{-/-} 0 e 4 semanas após a transferência de linfócitos T CD4⁺CD45RB^{high} isolados de camundongos WT e AIM2^{-/-}; **(F, G)** Frequência e número absoluto de linfócitos TCR-β⁺CD4⁺ (gate dentro de células CD45⁺ e células viáveis) em amostras de lâmina própria do cólon (LI-LP), linfonodos mesentéricos (mLNs) e baço (SP) de camundongos Rag1^{-/-} 4 semanas após a transferência de linfócitos T CD4⁺CD45RB^{high} isolados de camundongos WT e AIM2^{-/-}. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando p < 0,05, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p. N = 3-4. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via.

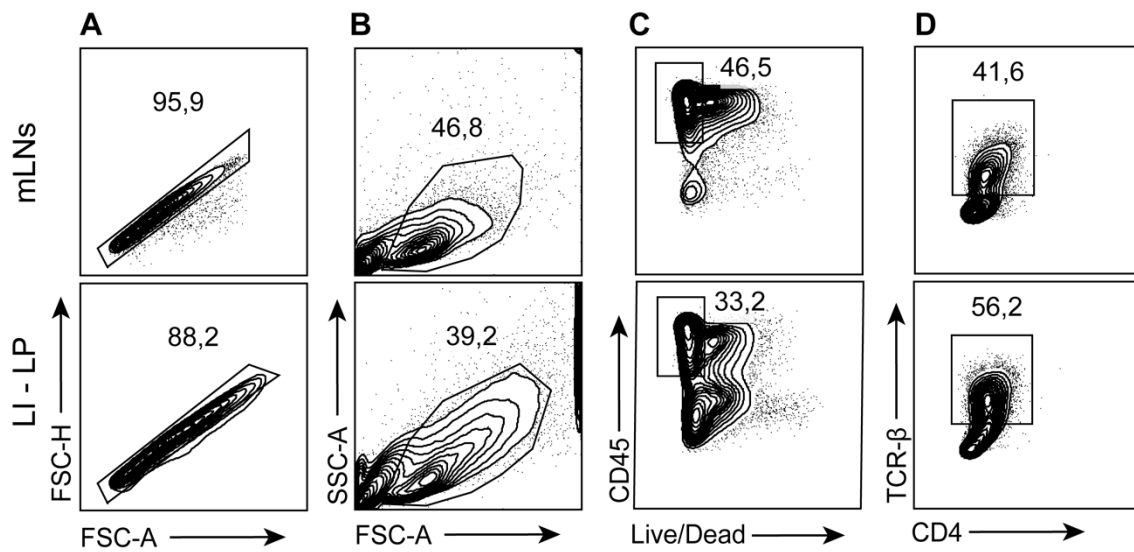


Figura 14 – Estratégia de *gate* para análise de populações de linfócitos T CD4⁺ em amostras de linfonodos mesentérico e lâmina própria; (A, B, C, D) Counter plot representando a frequência de células FSC-H⁺FSC-A⁺, SSC-A⁺FSC-A⁺, CD45⁺Live/Dead⁺, TCR-β⁺CD4⁺ em amostra de linfonodo mesentérico e lâmina própria do colón de camundongos Rag1^{-/-} após a transferência de linfócitos T CD4⁺CD45RB^{high} isolados de camundongos WT e AIM2^{-/-}.

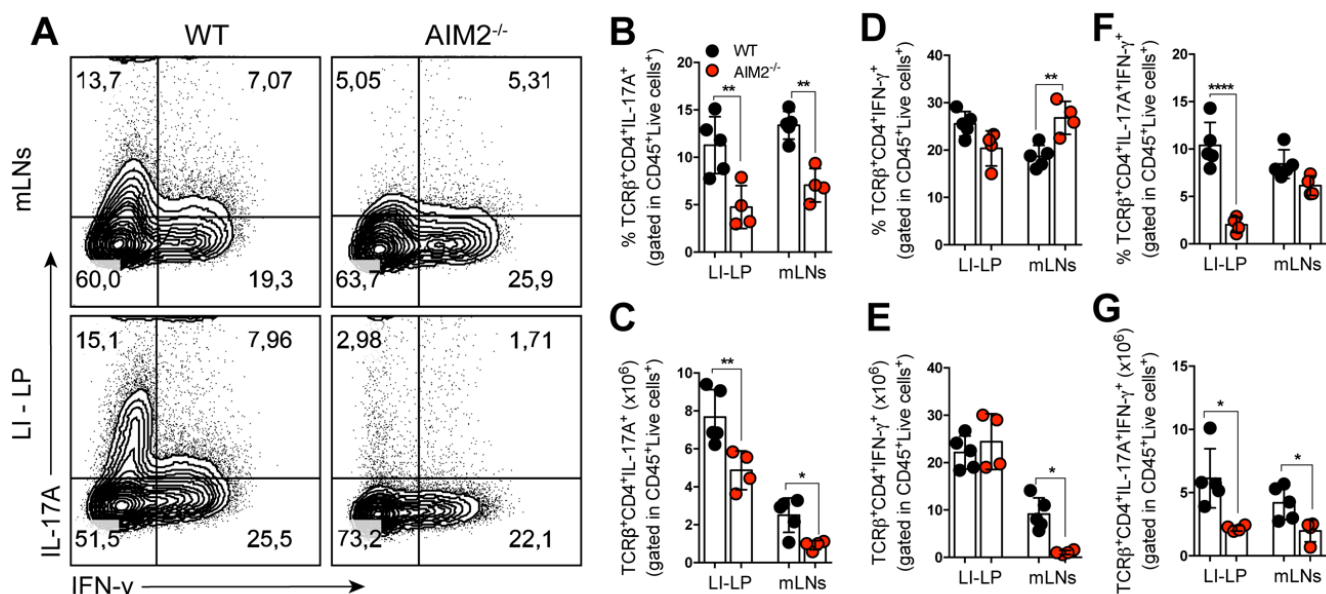


Figura 15 – Frequência de Linfócitos Th17 e Th1 no linfonodo mesentérico e lâmina própria de camundongos Rag1^{-/-} após transferência de Linfócitos CD4⁺ WT e AIM2^{-/-}; (A) *Counter plot* representando a frequência e número absoluto de linfócitos TCR-β⁺CD4⁺IL-17A⁺, TCR-β⁺CD4⁺ IFN-γ⁺ e TCR-β⁺CD4⁺IL-17A⁺IFN-γ⁺ (*gate* dentro de células CD45⁺ e células viáveis) em amostras de lâmina própria do cólon (LI-LP), linfonodos mesentéricos (mLNs) de camundongos Rag1^{-/-} 4 semanas após a transferência de linfócitos T CD4⁺CD45RB^{high} isolados de camundongos WT e AIM2^{-/-} (B, C) Frequência e número absoluto de linfócitos TCR-β⁺CD4⁺IL-17A⁺, (D, E) TCR-β⁺CD4⁺ IFN-γ⁺ e (F, G) TCR-β⁺CD4⁺IL-17A⁺IFN-γ⁺ (*gate* dentro de células CD45⁺ e células viáveis) em amostras de lâmina própria do cólon (LI-LP), linfonodos mesentéricos (mLNs) de camundongos Rag1^{-/-} 4 semanas após a transferência de linfócitos T CD4⁺CD45RB^{high} isolados de camundongos WT e AIM2^{-/-}. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando p < 0,05, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p. N = 4-6. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via.

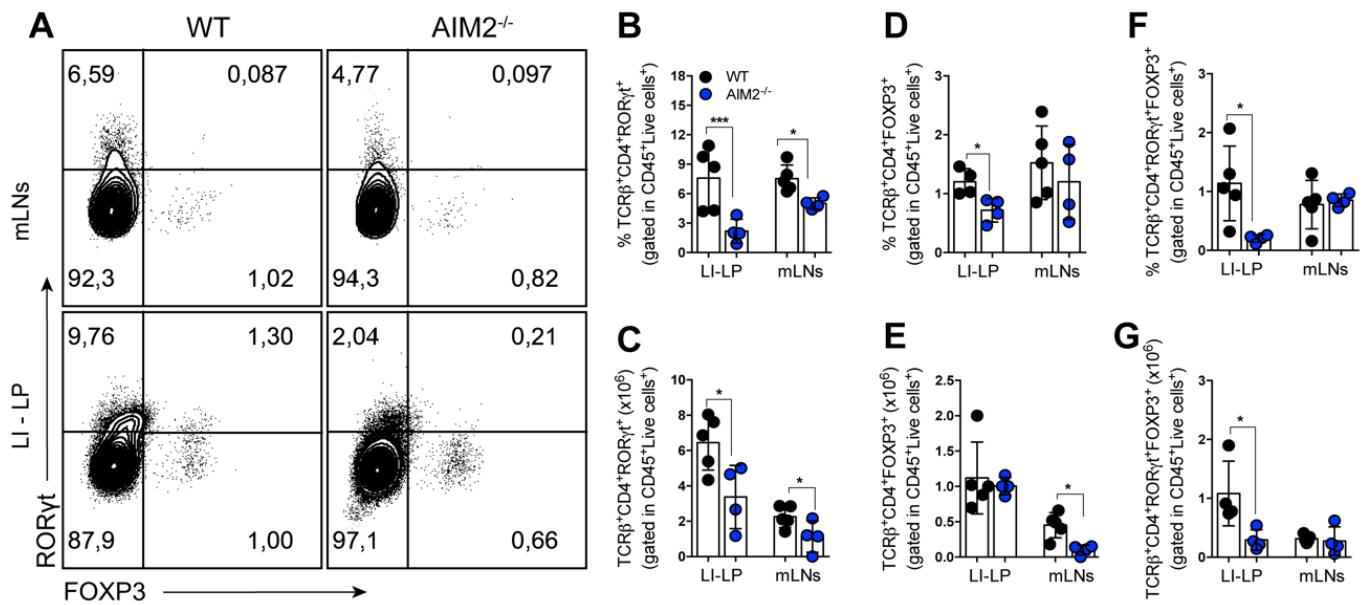


Figura 16 – Frequência de Linfócitos CD4⁺RORγt⁺ e CD4⁺FOXP3⁺ no linfonodo mesentérico e lâmina própria de camundongos Rag1^{-/-} após transferência de Linfócitos CD4⁺ WT e AIM2^{-/-}; (A) Counter plot representando a frequência e número absoluto de linfócitos TCR-β⁺CD4⁺RORγt⁺ e TCR-β⁺CD4⁺FOXP3⁺ e TCR-β⁺CD4⁺RORγt⁺FOXP3⁺ (gate dentro de células CD45⁺ e células viáveis) em amostras de lâmina própria do cólon (LI-LP), linfonodos mesentéricos (mLNs de camundongos Rag1^{-/-} 4 semanas após a transferência de linfócitos T CD4⁺CD45RB^{high} isolados de camundongos WT e AIM2^{-/-} (B, C) Frequência e número absoluto de linfócitos TCR-β⁺CD4⁺RORγt⁺, (D, E) TCR-β⁺CD4⁺FOXP3⁺ e (F, G) TCR-β⁺CD4⁺RORγt⁺FOXP3⁺ (gate dentro de células CD45⁺ e células viáveis) em amostras de lâmina própria do cólon (LI-LP), linfonodos mesentéricos (mLNs de camundongos Rag1^{-/-} 4 semanas após a transferência de linfócitos T CD4⁺CD45RB^{high} isolados de camundongos WT e AIM2. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando p < 0,05, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p. N = 3-6. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via.

4.12 DNA de dupla fita (dsDNA) não ativa AIM2 em linfócitos Th17

Posteriormente, foi avaliado se dsDNA poderia ativar AIM2 em linfócitos Th17 e aumentar a diferenciação destas células. Para isso, linfócitos Th17 foram diferenciados na presença de Poly dA:dT (dsDNA sintético agonista de AIM2). Utilizamos como controle experimental macrófagos previamente estimulados com LPS e Poly dA:dT.

Macrófagos WT estimulados com Poly dA:dT apresentaram maior frequência de caspase-1 em comparação com macrófagos AIM2^{-/-} que receberam o mesmo estímulo (**Figura 17A, B**). Além disso, macrófagos AIM2^{-/-} estimulados com Poly dA:dT produzem níveis de IL-1beta significativamente menores em comparação aos macrófagos WT (**Figura 17C**).

De forma interessante, linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-} diferenciados na presença de Poly dA:dT expressam níveis de caspase-1 semelhantes ao isotipo controle e aos controles que não foram estimulados com Poly dA:dT (**Figura 17D, E**) e produzem níveis de IL-1β e IL-17A similares (**Figura 17F, G**). Por outro lado, linfócitos Th17 AIM2^{-/-} não estimulados produzem menos IL-17A em comparação aos linfócitos Th17 WT não estimulados (**Figura 17G**), recapitulando o que foi observado nos resultados da figura 4.

Desta forma, estes resultados sugerem que AIM2 promove a diferenciação de linfócitos Th17 de forma independente do reconhecimento de dsDNA e ativação do inflamassoma.

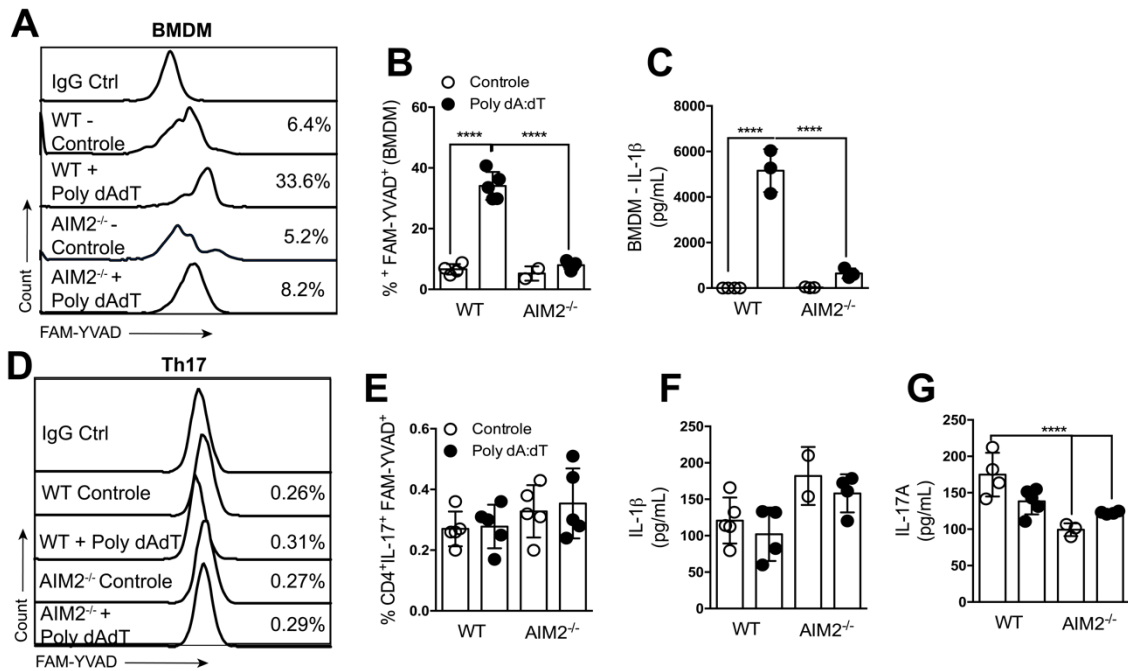


Figura 17 – Ativação de AIM2 por dsDNA em macrófagos e linfócitos Th17

(A, B) Histograma representando a frequência de macrófagos e linfócitos Th17 FAM-YVAD⁺ após estímulo com Poly dA:dT; (B, E) frequência de células CD11b⁺F4-80⁺FAM-YVAD⁺ e CD4⁺IL-17A⁺ WT e AIM2^{-/-} após estímulo com Poly dA:dT; (C, F) níveis de IL-1β detectados no sobrenadante das culturas de macrófagos e linfócitos Th17 estimulados com Poly dA:dT ou apenas meio de cultura; (G) níveis de IL-17A no sobrenadante da cultura de linfócitos Th17 estimulados com Poly dA:dT ou apenas meio de cultura; Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p . $N = 3-5$. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via.

4.13 AIM2 regula o perfil transcricional de linfócitos Th17

Os resultados acima sugerem que AIM2 promove a diferenciação de linfócitos Th17 de maneira independente do reconhecimento de dsDNA. Desta forma, nosso próximo objetivo foi analisar a expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à diferenciação de linfócitos Th17 em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-} na tentativa de entender se AIM2 poderia ser importante para expressão destes genes.

De forma interessante, observamos que em comparação com linfócitos Th17 WT, linfócitos Th17 deficientes de AIM2 expressam baixos níveis mRNA dos genes *Rorc*, *Rora*, *Stat3*, *Il1r1*, *Il23r* (**Figuras 18A, B, C, D, E, F**). Não obstante, linfócitos Th17 AIM2^{-/-} possuem aumento da expressão do gene *Foxp3* quando comparado aos linfócitos Th17 WT que não expressam esse gene (**Figura 18G**).

Em conjunto, estes resultados sugerem que a expressão de AIM2 regula a expressão de genes relacionados a diferenciação de linfócitos Th17, o que pode explicar a alteração encontrada na diferenciação destas células na ausência de AIM2.

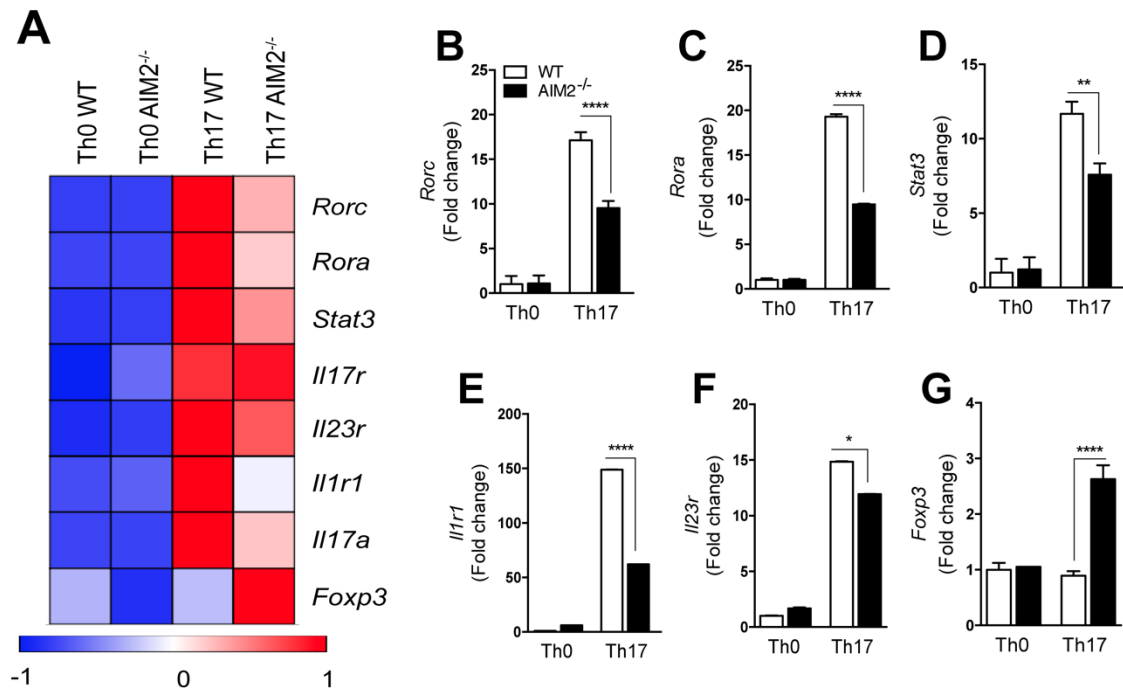


Figura 18 – Expressão de genes relacionados ao perfil de linfócitos Th17
(A, B) *Heat-map* representando a expressão de genes relacionados ao perfil de transcripcional de linfócitos Th17 em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}. A expressão foi representada por Log₂ de *fold change*; **(B, C, D, E, F, G)** Níveis de mRNA (*fold change*) dos genes *Rorc*, *Rora*, *Stat3*, *Il1r1*, *Il23r* e *Foxp3* em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-} 72 horas após a diferenciação. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando p < 0,05, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p. N = 3. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via.

4.14 AIM2 não altera a fosforilação do fator de transcrição STAT3 em linfócitos Th17

Os resultados da figura anterior sugerem que AIM2 regula a expressão de genes importantes para a diferenciação de linfócitos Th17. *Stat3* foi um dos genes com expressão reduzida na ausência de AIM2. O gene *Stat3* codifica o fator de transcrição STAT3 que, quando fosforilado, atua como um importante regulador na diferenciação de linfócitos Th17 (NISHIHARA et al., 2007; WEI et al., 2007). Desta forma, nosso próximo objetivo foi entender se a deficiência de AIM2 altera a fosforilação de STAT3 em linfócitos Th17.

Inicialmente, linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-} foram diferenciados e, posteriormente, a fosforilação de STAT3 foi quantificada através de citometria de fluxo. De forma interessante, observamos que a frequência e média de intensidade de fluorescência (MFI) de STAT3 fosforilado é similar entre Th17 WT e AIM2^{-/-} (**Figura 19A, B, C**). Para confirmar estes resultados, linfócitos T CD4⁺ foram isolados do baço e linfonodos de camundongos WT e AIM2^{-/-} e estimulados com IL-6 recombinantes por 30 minutos e, posteriormente, os níveis de STAT3 fosforilado foram avaliados. Os resultados demonstraram que a frequência e MFI de STAT3 fosforilado foi semelhante entre linfócitos T CD4⁺ WT e AIM2^{-/-} estimulados com IL-6, quando comparado aos linfócitos não estimulados (**Figura 19D, E, F**).

Em suma, estes resultados sugerem que a fosforilação de STAT3 não é alterada em linfócitos Th17 deficientes de AIM2, o que sugerem que AIM2 não interfere de forma positiva ou negativa na fosforilação de STAT3.

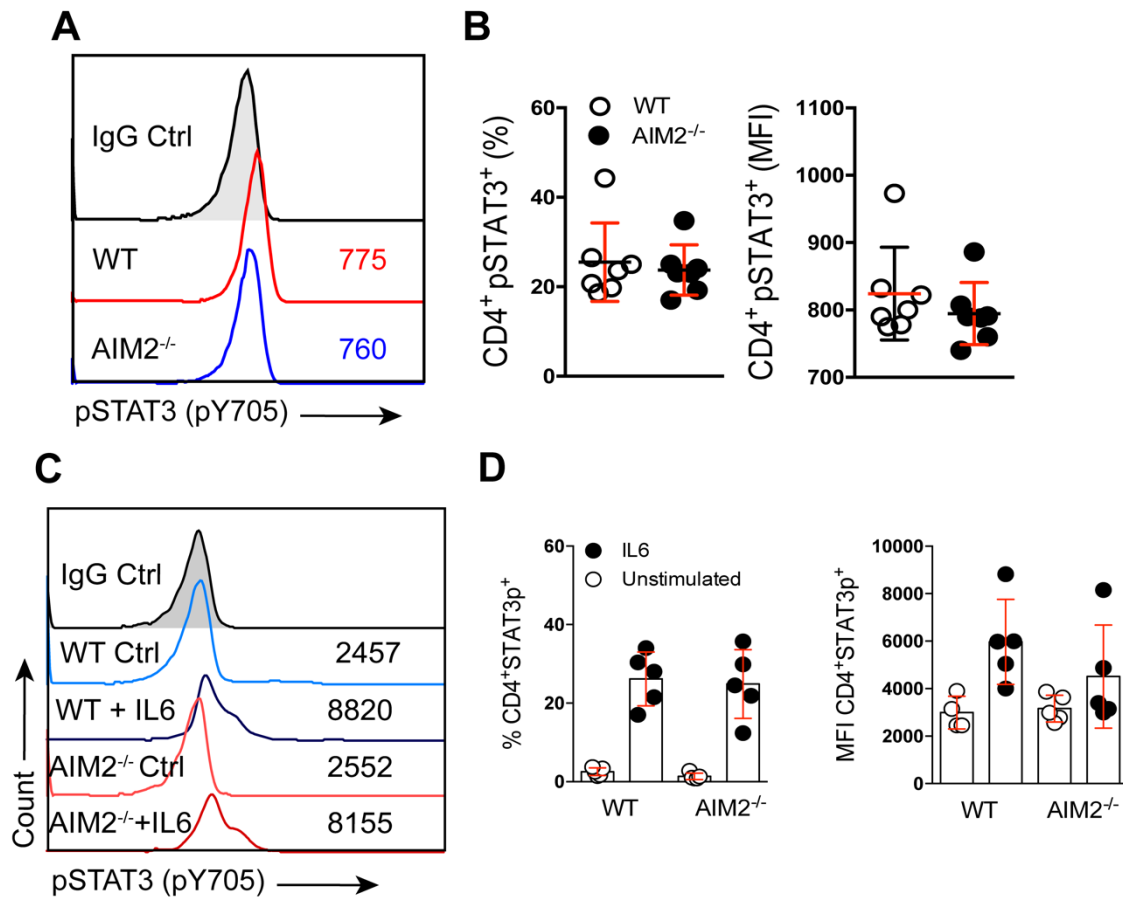


Figura 19 – Fosforilação de STAT3 em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}. (A, B) Histograma, frequência e MFI de pSTAT3 (pY705) em linfócitos CD4⁺ WT e AIM2^{-/-} em condições polarizantes para o perfil Th17; **(C, D)** Histograma, frequência e MFI de pSTAT3 (pY705) em linfócitos CD4⁺ WT e AIM2^{-/-} em não-estimulados e estimulados com IL-6 (20 ng/mL). Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p . $N = 5$. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via.

4.15 AIM2 é necessário para a expressão de RORyt em linfócitos Th17

Os resultados das figuras 18A e B mostraram que a expressão do gene *Rorc* está reduzida em linfócitos Th17 deficientes de AIM2. O gene *Rorc* codifica o fator de transcrição RORyt e foi inicialmente identificado como o fator de transcrição responsável pela diferenciação de linfócitos Th17 (IVANOV et al., 2006a). Desta forma, nosso próximo objetivo foi avaliar a expressão de RORyt em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}.

De forma interessante, linfócitos Th17 clássicos e patogênicos deficientes de AIM2 possuem baixa frequência e MFI de expressão de RORyt quando comparado aos linfócitos Th17 WT (**Figuras 20A, B, C, D**).

Em conjunto, estes resultados demonstram que a deficiência de AIM2 está associada com redução na expressão de RORyt em linfócitos Th17 convencionais e patogênicos.

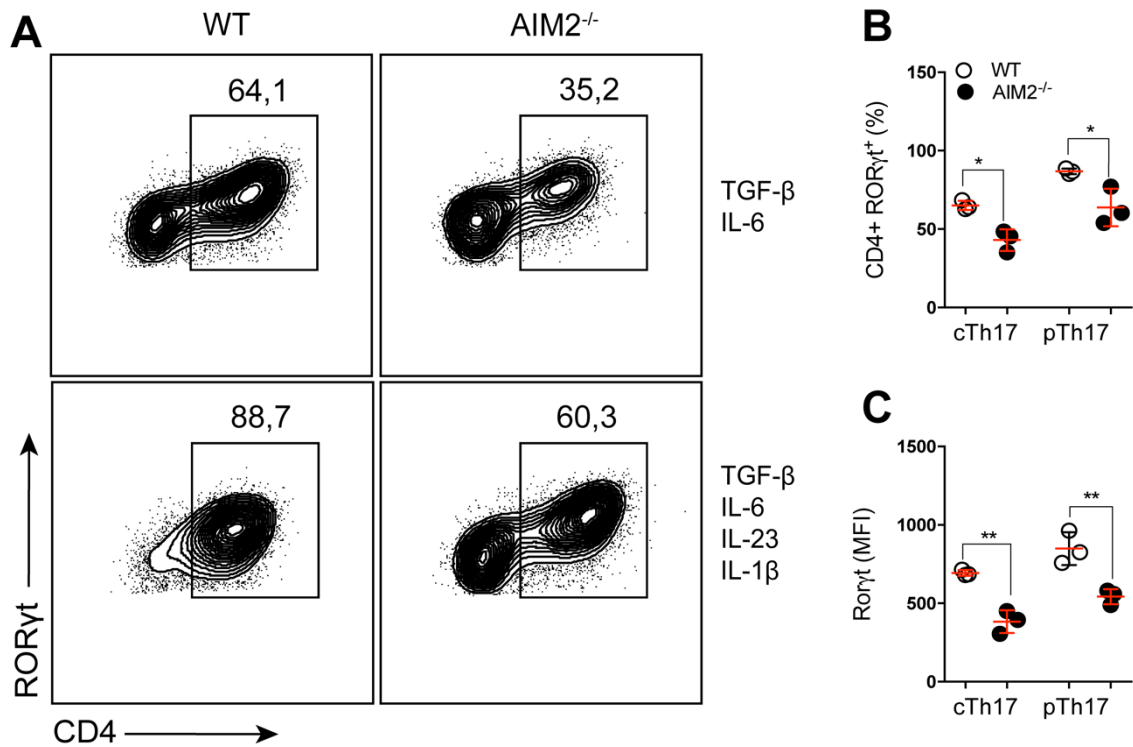


Figura 20 – Expressão de RORγt em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}. (A, B, C) *Counter plot*, frequência e MFI representando a expressão de RORγt⁺ em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-} diferenciados sobre condições polarizantes para o perfil convencional (TGF-β, IL-6) e patogênicos (TGF-β, IL-6, IL-23, IL-1β). Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p . $N = 3$. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via.

4.16 AIM2 regula a expressão dos receptores IL-1R1 e IL-23R em linfócitos Th17

Os resultados da figura anterior demonstraram que AIM2 é necessário para a expressão do fator de transcrição ROR γ t. Adicionalmente, a expressão gênica de *Rora*, *Il1r1* e *Il23r* estão reduzidos em linfócitos Th17 deficientes de AIM2. Nesse sentido, a expressão de IL-1R1 e IL-23R em linfócitos Th17 depende dos fatores de transcrição ROR γ t e ROR α (CHUNG et al., 2009b). Desta forma, nosso próximo passo foi avaliar a expressão de IL-1R1 e IL-23R em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}.

De forma interessante, a frequência de expressão de IL-1R1 em linfócitos Th17 deficientes de AIM2 é significativamente menor quando comparado aos linfócitos Th17 WT (**Figura 21A**). Além disso, a deficiência de AIM2 em linfócitos Th17 também parece afetar a expressão de IL-23R quando comparado a linfócitos Th17 WT (**Figura 22B**).

Em conjunto, estes resultados sugerem que AIM2 promove a expressão de IL-1R1 e IL-23R, provavelmente através de ROR γ t, uma vez que a expressão de ROR γ t está reduzida em linfócitos Th17 deficientes de AIM2.

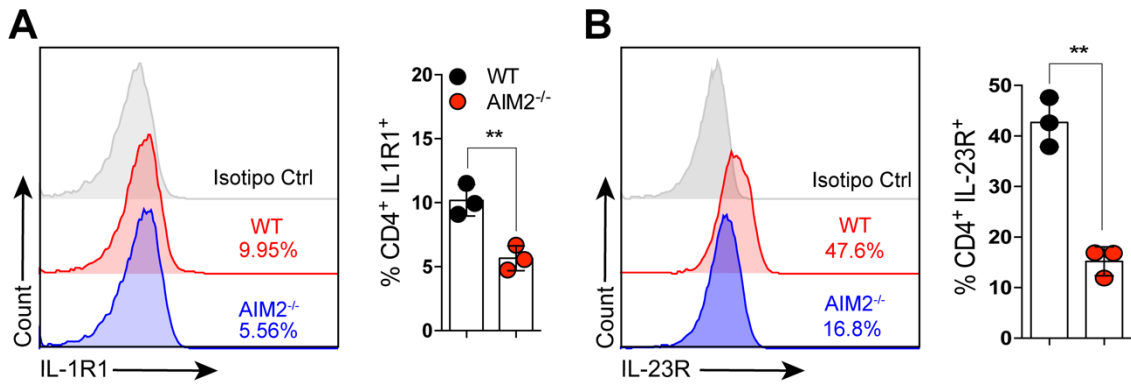


Figura 21 – Expressão de IL-1R1 e IL-23R em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}. (A, B) Histograma e frequência representando a expressão de IL-1R1 e IL-23R em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-} diferenciados sobre condições polarizantes para o perfil Th17. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p . $N = 3$. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por teste-t.

4.17 AIM2 regula a expressão de FOXP3 em linfócitos Th17

A diferenciação de linfócitos Th17 e Tregs compartilham em comum sinalização de TGF- β . Nesse sentido, baixas concentrações de TGF- β em sinergismo com IL-6 e IL-21 induz a diferenciação de linfócitos Th17, enquanto altas concentrações inibem a diferenciação de linfócitos Th17 e favorecem expressão de FOXP3 e a diferenciação de Tregs. Além disso, FOXP3 interage com ROR γ t e inibe sua capacidade de ligar-se na região promotora de *Il-17a* (ICHIYAMA et al., 2008a; ZHOU et al., 2008).

Conforme demonstrado nos resultados anteriores, linfócitos Th17 deficientes de AIM2 expressam níveis significativamente maiores de mRNA de *Foxp3* em comparação com linfócitos Th17 WT. Desta forma, nosso próximo objetivo foi avaliar a expressão proteica de FOXP3 em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}. De forma interessante, a frequência de FOXP3 em linfócitos Th17 AIM2^{-/-} é significativamente maior quando comparado à linfócitos Th17 WT. Não obstante, a maior expressão de FOXP3 em linfócitos Th17 AIM2^{-/-} está associada com menor frequência de IL-17A por estas células em comparação com as células WT (**Figura 22A, B, C**).

Em suma, estes resultados sugerem que AIM2 é necessário para controlar a expressão de FOXP3 em linfócitos Th17.

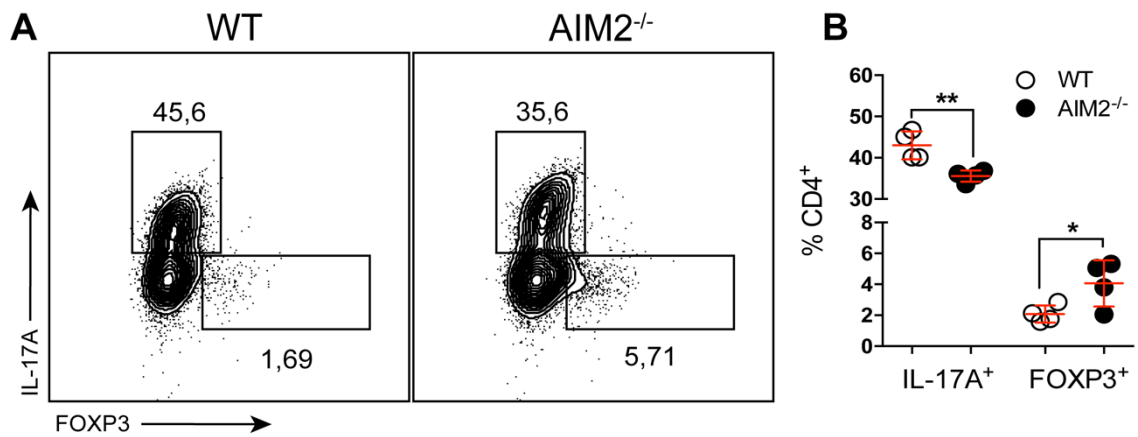


Figura 22 – Expressão de FOXP3 em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-} (A, B, C)
Counter plot, frequência de IL-17A e FOXP3 em linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}. Os resultados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$, e os asteriscos (*) representam o nível de significância de acordo com o valor de p . $N = 3$. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via.

4.18 AIM2 localiza-se no núcleo de linfócitos Th17 e interage fisicamente com ROR γ t

De acordo com os resultados anteriores, AIM2 promove a diferenciação de linfócitos Th17 independentemente de sua ativação por dsDNA, função esta exercida no citoplasma. Em contrapartida, linfócitos Th17 deficientes de AIM2 apresentam expressão de ROR γ t comprometida, o que pode estar associada com a menor expressão de IL-1R1 e IL-17A e maior expressão de FOXP3. Desta forma, estes resultados sugerem que AIM2 pode regular direta ou indiretamente a expressão e função de ROR γ t.

Para testar essa hipótese, inicialmente avaliamos a localização celular de AIM2 em linfócitos Th17 através de *western blot* de proteínas derivadas do citoplasma e núcleo de linfócitos Th0 e Th17 e microscopia confocal. De forma interessante, observamos que AIM2 está localizado no citoplasma de linfócitos Th0, enquanto em linfócitos Th17 localiza-se principalmente no núcleo quando comparado ao citoplasma (**Figura 23A, B**).

Posteriormente, nosso próximo objetivo foi investigar se AIM2 poderia interagir fisicamente com ROR γ t em linfócitos Th17. Para isso, foi realizado ensaio de co-immunoprecipitação de proteínas totais de linfócitos Th17 com anticorpo anti-AIM2 e em seguida tais proteínas foram analisadas por *western blot* quanto a detecção de ROR γ t. De forma interessante, as análises de co-immunoprecipitação revelaram que AIM2 interage fisicamente com ROR γ t em linfócitos Th17 (**Figura 24A**). Adicionalmente, foi observado que AIM2 se colocaliza com ROR γ t no núcleo de linfócitos Th17 (**Figura 24B**).

Em conjunto, estes resultados demonstram que AIM2 interage fisicamente com ROR γ t em linfócitos Th17. Desta forma, é possível que essa interação seja necessária para que ROR γ t desempenhe sua função e induza a produção de IL-17A e diferenciação de linfócitos Th17.

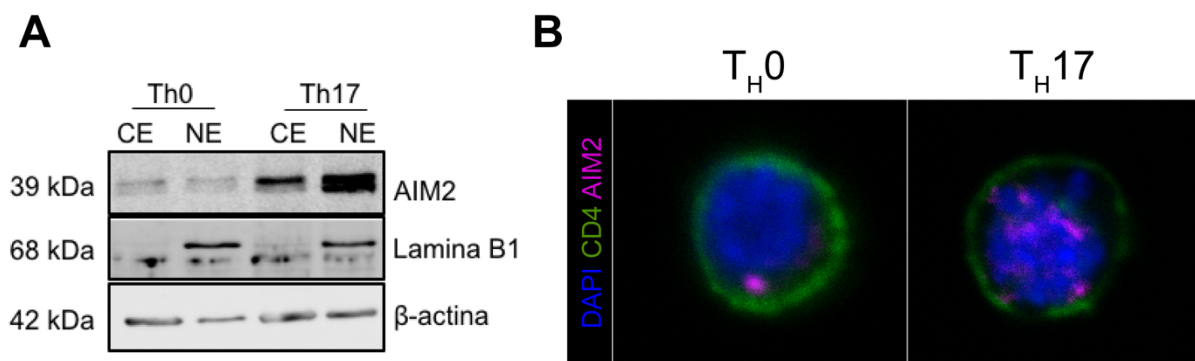


Figura 23 – Expressão de AIM2 no citoplasma e núcleo de linfócitos Th17 WT e AIM2^{-/-}. (A) Western blot de AIM2, Lamina B1 e β -actina em amostras de proteínas de citoplasma (CE) e núcleo (NE); (B) Microscopia confocal de imunofluorescência de AIM2 em linfócitos Th0 e Th17 – DAPI (azul), CD4 (verde), AIM2 (violeta).

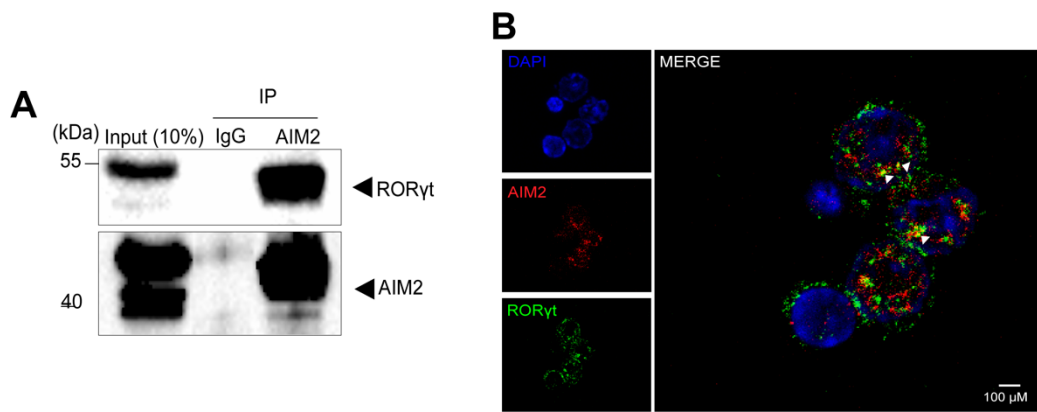


Figura 24 – Interação entre AIM2 e RORγt em Linfócitos Th17. (A) Co-immunoprecipitação de AIM2 em Linfócitos Th17. Linfócitos Th17 (1×10^7) foram lisados e incubados com Isotipo controle (IgG) e anti-AIM2. Posteriormente, foi realizada a co-immunoprecipitação de proteínas e marcação por Western blot de RORγt; **(B)** Microscopia confocal de imunofluorescência de AIM2 e RORγt em linfócitos Th17 – DAPI (azul), RORγt (verde), AIM2 (vermelho).

5. Discussão

Neste estudo, foi observado que o receptor AIM2 é expresso em linfócitos Th17 e sua expressão está associada com a diferenciação destas células. De forma interessante, a deficiência de AIM2 está associada com menor produção de IL-17A por linfócitos Th17, assim como menor expressão do fator de transcrição ROR γ t e dos receptores IL-1R1 e IL-23R. Não obstante, a transferência adotiva de linfócitos T CD4⁺ naïves provenientes de camundongos AIM2^{-/-} para camundongos Rag1^{-/-} falhou em induzir o desenvolvimento de colite nestes camundongos, ao passo que o menor desenvolvimento de inflamação intestinal foi associado com redução frequência de linfócitos Th17 e linfócitos Th17 produtores de IL-17A e IFN- γ na lâmina própria do colón. A função de AIM2 em linfócitos Th17 acontece independente de sua função de sensor de DNA e ativação do inflamassoma. Ademais, nossos resultados demonstraram que AIM2 interage fisicamente com ROR γ t em linfócitos Th17 e possivelmente promove a diferenciação destas células através da regulação da função de ROR γ t.

Nos últimos anos, inúmeros estudos têm investigado a função sensores citoplasmáticos que desempenham funções nas células do sistema imune inato em células do sistema imune adaptativo. Dentre essas moléculas destacam-se os estudos de NLRP3 em linfócitos Th1, Th2 e Treg (ARBORE et al., 2016; BRUCHARD et al., 2015; PARK et al., 2019) e estudos que demonstraram as funções de ASC (MARTIN et al., 2016) e caspase-1 em linfócitos Th17 (GAO et al., 2020). Os achados destes estudos contribuíram para desmistificar o conhecimento que tínhamos até anos atrás de que tais moléculas desempenhavam apenas funções em células do sistema imune inato. Hoje sabemos que a expressão destas moléculas em diferentes subtipos de linfócitos T auxiliares é necessária para regulação da diferenciação e funções efetoras destas células. No que diz respeito a função de AIM2 em linfócitos, o pouco que sabemos é que AIM2 está envolvido na diferenciação e função de linfócitos B (EL-ZAATARI et al., 2020; SVENSSON et al., 2017; YANG et al., 2021), células T reguladoras (CHOU et al., 2021) e linfócitos T foliculares (WU et al., 2022).

A expressão de AIM2 é aumentada em linfócitos B e essas células produzem altos níveis de IL-1 β após estímulo *in vitro* com o agonista de AIM2 Poly dA:dT (SVENSSON et al., 2017). Não obstante, El-Zaatari et al., (2020), demonstraram elevada expressão de AIM2 em linfócitos B isolados de tecidos gástricos de camundongos infectados com *Helicobacter felis*. De forma

interessante, linfócitos B deficientes de AIM2 produzem níveis elevados de CXCL16 que contribui para o recrutamento de linfócitos T CD8⁺ para o tecido gástrico e promove a inflamação deste tecido após a infecção, sugerindo um mecanismo intrínseco de AIM2 na regulação da produção da quimiocina CXCL16 por linfócitos B (EL-ZAATARI et al., 2020). Adicionalmente, AIM2 é altamente expresso em linfócitos B do centro germinativo, linfócitos B de memória e plasmócitos isolados em pacientes com lúpus. Em um modelo experimental de lúpus, AIM2 desempenha um papel importante na diferenciação de linfócitos B através da regulação da função dos fatores de transcrição BCL-6 e Blimp-1 (YANG et al., 2021).

Em linfócitos T, o perfil de metilação e expressão gênica de AIM2 em linfócitos T CD4⁺ de memória é significativamente aumentado quando comparado à linfócitos T naíves (KOMORI et al., 2015). Não obstante, a expressão de AIM2 em linfócitos T CD4⁺ é necessária para a função de células T reguladoras. Células Tregs deficientes de AIM2 exibem expressão comprometida do fator de transcrição FOXP3, que foi associado com aumento da fosforilação de AKT e sinalização aprimorada de mTOR e Myc. AIM2 interage com RACK1-PP2A fosfatases a fim de conter a fosforilação de AKT contribuindo para a função Tregs (CHOU et al., 2021). De forma interessante, WU et al., (2022) demonstraram que AIM2 é regulador positivo da diferenciação de linfócitos T foliculares (TFh). Nesse sentido, AIM2 é altamente expresso em linfócitos T foliculares e a deficiência de AIM2 reduz significativamente a resposta dessas células. Não obstante, os autores observaram que AIM2 está localizado no núcleo de linfócitos T foliculares e interage com o fator de transcrição c-MAF regulando de maneira positiva a diferenciação dessas células (WU et al., 2022).

De forma interessante, o estudo de WU et al. (2022) citado anteriormente demonstrou que linfócitos Th17 apresentam alta expressão de AIM2, contudo, os autores não investigaram se a deficiência de AIM2 altera a diferenciação de linfócitos Th17 (WU et al., 2022). Nesse sentido, um estudo do nosso grupo demonstrou que a deficiência de AIM2 está associada com menor frequência de linfócitos Th17 nos linfonodos pancreáticos e níveis reduzidos de IL-17A no pâncreas em um modelo experimental de diabetes tipo 1 (LEITE et al., 2020). De forma semelhante, camundongos AIM2^{-/-} infectados com *Schistosoma mansoni* possuem redução na diferenciação de linfócitos Th17 durante a infecção (MORAELES et al., 2021). Por outro lado, a frequência de linfócitos Th17 está

aumentada no sistema nervoso central e diminuída no baço de camundongos AIM2^{-/-} submetidos ao modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) (CHOU et al., 2021). Desta forma, os mecanismos de AIM2 envolvidos na diferenciação de linfócitos Th17 ainda não são compreendidos.

De acordo com nossos resultados, AIM2 é expresso durante os estágios iniciais da diferenciação de linfócitos Th17. Adicionalmente, linfócitos T CD4⁺ previamente ativados com anti-CD3/CD28 e estimulados com TGF-β expressam significativamente níveis elevados de mRNA mensageiro de AIM2. Esses resultados corroboram com os resultados do estudo de Chou et al., 2021, em que TGF-β induziu aumento da expressão de AIM2 em células T reguladoras de maneira dose dependente (CHOU et al., 2021). Em contrapartida, linfócitos T CD4⁺ previamente ativados com anti-CD3/CD28 e estimulados apenas com IL-6 não expressam níveis significativos de AIM2. Porém o estímulo de linfócitos T CD4⁺ previamente ativados com anti-CD3/CD28 com TGF-β e IL-6 induz aumento da expressão de AIM2. Desta forma, estes resultados sugerem que a expressão de AIM2 em linfócitos Th17 requer o sinergismo de TGF-β e IL-6. Esses resultados estão associados com as observações de que a região promotora de *Aim2* em linfócitos Th17 está aberta e acessível para a ligação de fatores de transcrição. Nesse sentido, fatores de transcrição envolvidos na diferenciação de linfócitos Th17 como IRF4, STAT3, BATF, c-MAF e p-300 estão ligados região promotora de *Aim2* em linfócitos Th17. Além disso, também observamos que AIM2 é expresso em linfócitos Th17 na mucosa intestinal, assim como por outras células como Th1, Th2 e subpopulações de células Treg.

Em outros subtipos celulares, a expressão de AIM2 é induzida por IFN-γ (DAWSON; TRAPANI, 1996; DEYOUNG et al., 1997; HORNUNG et al., 2009). No nosso estudo, não avaliamos se IFN-γ induz a expressão de AIM2 em linfócitos Th17, pois nas condições polarizantes *in vitro*, e também na diferenciação de linfócitos Th17 *in vivo*, a sinalização de IFN-γ inibe a diferenciação de linfócitos Th17 sendo necessário o bloqueio de IFN-γ (VELDHOEN et al., 2009; YEH; MCWILLIAMS; HARRINGTON, 2014). Desta forma, acreditamos que a expressão de AIM2 em linfócitos Th17 é mediada de maneira independente da sinalização de IFN-γ por um mecanismo ainda não conhecido.

A expressão de AIM2 em linfócitos T CD4⁺ parece ser um fator importante para a diferenciação de linfócitos Th17. Na ausência de AIM2, linfócitos Th17

convencionais e patogênicos produzem níveis significativamente menores de IL-17A quando comparados aos linfócitos Th17 WT em condições polarizantes *in vitro*. Adicionalmente, existe diminuição da frequência de expressão de IL-17A por linfócitos Th17 presentes no baço e linfonodos mesentéricos de camundongos AIM2^{-/-}. De forma similar, linfócitos T CD4⁺CD44^{high} caracterizadas como células T efetoras, produzem níveis menores de IL-17A na ausência de AIM2.

Linfócitos Th17 são importantes para controle de patógenos como bactérias e fungos, e atuam na manutenção da homeostase em superfícies de mucosa, como intestino, pele e pulmão. Contudo, em situações de disbiose causada por microrganismos patobiontes e/ou por influências ambientais como dieta, os linfócitos Th17 podem se converter em células patogênicas, alterando sua plasticidade e expressando os fatores de transcrição STAT4 e T-bet, culminando na produção de IL-17A e IFN- γ (HARBOUR et al., 2015; STOCKINGER; OMENETTI, 2017). Desta forma, a patogenicidade de linfócitos Th17 é um dos principais fatores relacionados ao desenvolvimento de doenças autoimunes. Nesse sentido, observamos que a deficiência de AIM2 em linfócitos T CD4⁺ está associada com menor diferenciação de células Th17 produtoras de IL-17A e que co-expressam IL-17A e IFN- γ na lâmina própria intestinal após transferência adotiva para camundongos Rag1^{-/-}. Não obstante, a menor diferenciação destas células para o perfil patogênico na ausência de AIM2 protegeu contra o desenvolvimento de colite. A participação de AIM2 na patogênese da colite foi estudada nos últimos anos em modelos experimentais. Em todos os estudos, os autores observaram que AIM2 possui um papel protetor contra o desenvolvimento da doença, e isso está associado com a regulação da homeostase intestinal. Contudo, em nenhum destes estudos foi investigado a produção de IL-17A por linfócitos T CD4⁺ entre camundongos WT e AIM2^{-/-} (HU et al., 2015; RATSIMANDRESY et al., 2017). No modelo de EAE, camundongos AIM2^{-/-} são suscetíveis a doença e apresentam maior frequência de linfócitos Th17 produtores de IL-17A e IFN- γ no sistema nervoso central em comparação aos WT. Tal suscetibilidade ocorre devido a menor expressão de FOXP3 na ausência de AIM2 no local da inflamação (CHOU et al., 2021). Desta forma, os resultados deste estudo são contraditórios aos nossos resultados encontrados no modelo de colite induzida por transferência de linfócitos T. Apesar de linfócitos T CD4⁺ AIM2^{-/-} expressarem menos FOXP3, os mesmos desenvolvem menos

colite quando comparados aos camundongos que receberam linfócitos T CD4⁺, o que sugere a existência de mecanismos de supressão não dependentes de FOXP3. Uma possibilidade seria a maior produção de IL-10 por células Tr1 na ausência de AIM2, uma vez que estas células produzem IL-10 independente da expressão de FOXP3 (BROCKMANN et al., 2018). De forma geral, os resultados do nosso estudo são contraditórios em algumas partes com os resultados do estudo de Chou et al., (2021). Para melhor entender a participação AIM2 na diferenciação de linfócitos Th17 *in vivo*, seria ideal a utilização de estratégias mais sofisticadas como camundongos com deleção condicional de AIM2 apenas em células produtoras de IL-17A (IL-17a^{cre}) ou que expressam RORγt (Rorc^{cre}) o que permitiria a exclusão de interferências ocasionadas pela expressão de AIM2 em outros subtipos celulares.

Estudo prévio de Imanishi et al., (2014), demonstrou que linfócitos T são capazes de internalizar DNA proveniente de células mortas e estimular a diferenciação de linfócitos Th2 (IMANISHI et al., 2014). Desta forma, avaliamos se tal mecanismo também poderia ocorrer em linfócitos Th17 estimulados com dsDNA agonista de AIM2 (poly dA:dT). Contudo os resultados do nosso estudo, demonstraram que AIM2 promove a diferenciação de linfócitos Th17 de forma independente do reconhecimento de dsDNA e ativação do inflamassoma. A ativação do inflamassoma de AIM2 requer a sinalização da proteína adaptadora ASC e a clivagem proteolítica das citocinas pró-IL1β e pró-IL-18 em suas formas biologicamente ativas (KUMARI et al., 2020). Nesse sentido, a expressão intrínseca de ASC em linfócitos T CD4 promove a diferenciação de linfócitos Th17 após ativação do inflamassoma por ATP que culmina no processamento e produção de IL-1β via caspase-8 (MARTIN et al., 2016). Por outro lado, a expressão de caspase-1 em linfócitos T CD4 promove a diferenciação de linfócitos Th17 de forma independente da ativação do inflamassoma (GAO et al., 2020).

A diferenciação de linfócitos Th17 requer um programa transcricional complexo que envolve às funções de diversos fatores de transcrição, como por exemplo, RORγt, STAT3 e IRF4 (BRÜSTLE et al., 2007; IVANOV et al., 2006a; IVANOV; ZHOU; LITTMAN, 2007; NISHIHARA et al., 2007; WEI et al., 2007). Os resultados do nosso estudo demonstraram que AIM2 não altera a fosforilação de STAT3. Por outro lado, linfócitos Th17 deficientes de AIM2 expressam níveis significativamente menores do fator de transcrição RORγt e do gene *Rora*, que

codifica o fator de transcrição ROR α . Não obstante, a ausência de AIM2 em linfócitos Th17 está associada com redução na expressão gênica de *Il1r1* e *Il23r* e na expressão proteica de IL-1R1 e IL-23R. A expressão dessas moléculas é essencial para a diferenciação e função de linfócitos Th17 e são dependentes da expressão de ROR γ t e ROR α (CHUNG et al., 2009c; ZHOU et al., 2008). Desta forma, nossos resultados sugerem que AIM2 é necessário para a função de ROR γ t e consequente expressão de IL-1R1 e IL-23R.

A diferenciação de linfócitos Th17 depende de baixas doses de TGF- β em associação com o sinergismo de IL-6 (MANGAN et al., 2006; VELDHOFEN et al., 2006). Em condições de elevadas concentrações de TGF- β , linfócitos Th17 alteram sua plasticidade e passam a expressar o fator de transcrição FOXP3, este que por sua vez inibe a atividade de ROR γ t (ICHIYAMA et al., 2008b; ZHOU et al., 2008). Nesse sentido, linfócitos Th17 deficientes de AIM2 expressam níveis significativamente maiores de FOXP3. Acreditamos que tal expressão poderia estar associada com a inibição de ROR γ t em linfócitos Th17 AIM2^{-/-} o que também poderia explicar sua menor expressão, dos receptores IL-1R1, IL-23R e menor produção de IL-17A. Desta forma, nossos dados sugerem que AIM2 é importante para impedir a inibição de ROR γ t mediada por FOXP3.

Os resultados do nosso estudo sugerem que AIM2 promove a diferenciação de linfócitos Th17 provavelmente através da regulação da ativação de ROR γ t. Através de análises de co-immunoprecipitação, observamos que AIM2 interage fisicamente com ROR γ t em linfócitos Th17. Desta forma este resultado reforça a nossa hipótese, uma vez que possivelmente tal interação possa contribuir para a melhor ligação de ROR γ t nas regiões promotoras de *Il-17a*, *Il1r1* e *Il23r*, além de impedir a inibição da atividade de ROR γ t mediada por FOXP3. Não obstante, também detectamos níveis proteicos de AIM2 e co-localização de AIM2 e ROR γ t no núcleo de linfócitos Th17. Contudo, análises mais específicas, como por exemplo, imunoprecipitação da cromatina, seriam necessárias para confirmar tal função.

6. Conclusão

Os resultados encontrados neste estudo promoveram a descoberta da função de AIM2 em um outro tipo celular, os linfócitos Th17.

De forma geral, observamos que AIM2 é expresso em linfócitos Th17 diferenciados *in vitro* e também em linfócitos Th17 presentes na mucosa intestinal.

O receptor AIM2 é um regulador positivo da diferenciação de linfócitos Th17, regulando a expressão do fator de transcrição ROR γ t, e dos receptores IL-1R1 e IL-23R e consequente produção de IL-17A. Além disso, AIM2 promove a diferenciação de linfócitos Th17 *in vivo* e desenvolvimento de colite mediada por linfócitos T CD4⁺.

O receptor AIM2 localiza-se no núcleo de linfócitos Th17 e interage com o fator de transcrição ROR γ t (**Figura 25**). Uma vez que AIM2 possui domínios de ligação em DNA, e que está presente no núcleo de linfócitos Th17, é possível que AIM2 atue como um regulador transcricional e regule a expressão de *Rorc* diretamente ou indiretamente. Contudo, análises mais detalhadas são necessárias para investigar essa hipótese.

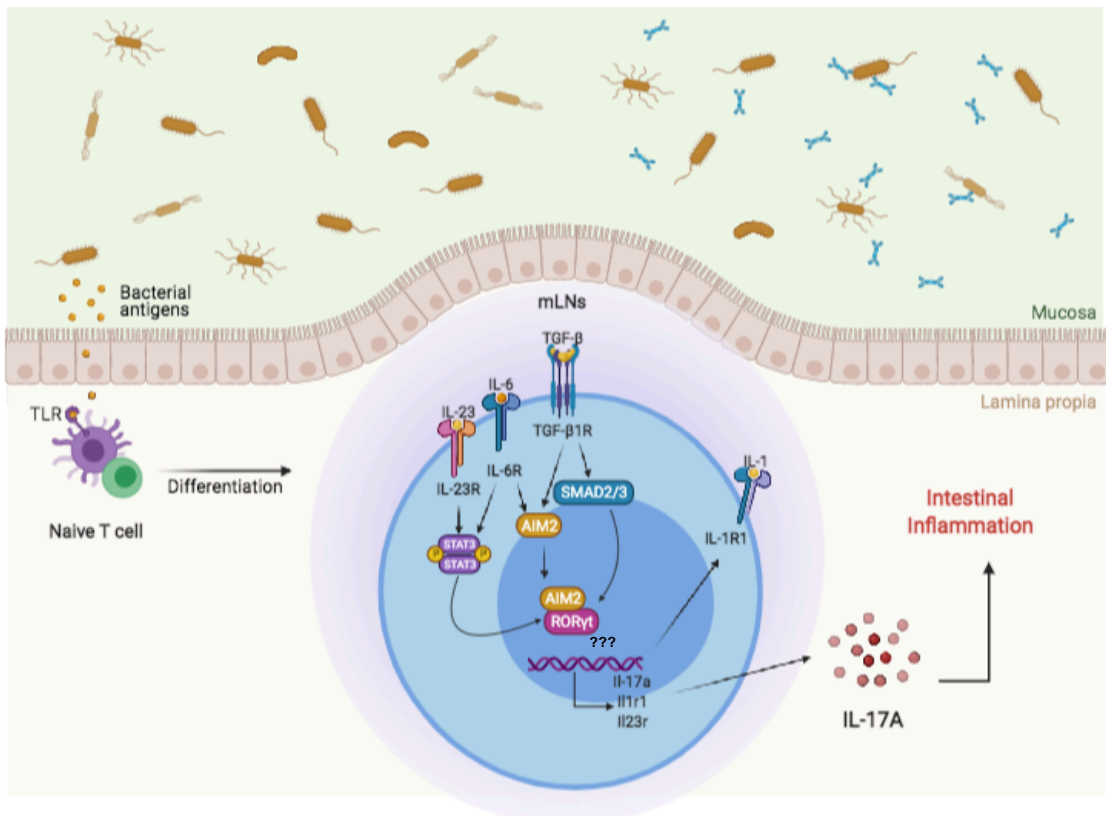


Figura 25 – Mecanismo de AIM2 na diferenciação de linfócitos Th17. Durante a diferenciação de linfócitos Th17, a sinalização de TGF-β e IL-6 promovem a expressão de AIM2. Uma vez expresso, AIM2 localiza-se no núcleo e interage com o fator de transcrição RORγt, este que por sua vez liga-se na região promotora dos genes *Ilr1*, *Il23r* e *Il-17a* promovendo a transcrição e consequente expressão de IL-1R1 e IL-23R e produção de IL-17A. Ademais, a expressão intrínseca de AIM2 em linfócitos T CD4⁺ promove a diferenciação de linfócitos Th17 na mucosa intestinal e consequente inflamação intestinal.

7. Referências bibliográficas

AHLFORS, Helena; MORRISON, Peter J.; DUARTE, João H.; LI, Ying; BIRO, Judit; TOLAINI, Mauro; DI MEGLIO, Paola; POTOČNIK, Alexandre J.; STOCKINGER, Brigitta. IL-22 fate reporter reveals origin and control of IL-22 production in homeostasis and infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 193, n. 9, p. 4602–4613, 2014. DOI: 10.4049/JIMMUNOL.1401244. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25261485/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

ARBORE, Giuseppina et al. T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4⁺ T cells. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 352, n. 6292, 2016. DOI: 10.1126/SCIENCE.AAD1210. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27313051/>. Acesso em: 6 dez. 2021.

BETTELLI, Estelle; CARRIER, Yijun; GAO, Wenda; KORN, Thomas; STROM, Terry B.; OUKKA, Mohamed; WEINER, Howard L.; KUCHROO, Vijay K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature** 2006 441:7090, [S. l.], v. 441, n. 7090, p. 235–238, 2006. DOI: 10.1038/nature04753. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature04753>. Acesso em: 2 dez. 2021.

BOTTO, Sara; ABRAHAM, Jinu; MIZUNO, Nobuyo; PRYKE, Kara; GALL, Bryan; LANDAIS, Igor; STREBLOW, Daniel N.; FRUH, Klaus J.; DEFILIPPIS, Victor R. Human Cytomegalovirus Immediate Early 86-kDa Protein Blocks Transcription and Induces Degradation of the Immature Interleukin-1 β Protein during Virion-Mediated Activation of the AIM2 Inflammasome. **mBio**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2019. DOI: 10.1128/MBIO.02510-18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30755509/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

BROCKMANN, Leonie et al. Molecular and functional heterogeneity of IL-10-producing CD4⁺ T cells. **Nature Communications** 2018 9:1, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–14, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-07581-4. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-07581-4>. Acesso em: 6 dez. 2021.

BRUCHARD, Mélanie et al. The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. **Nature Immunology** 2015 16:8, [S. l.], v. 16, n. 8, p. 859–870, 2015. DOI: 10.1038/ni.3202. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni.3202>. Acesso em: 6 dez. 2021.

BRÜSTLE, Anne et al. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. **Nature immunology**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 958–966, 2007. DOI: 10.1038/NI1500. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17676043/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

CHOU, Wei Chun et al. AIM2 in regulatory T cells restrains autoimmune diseases. **Nature**, [S. l.], v. 591, n. 7849, 2021. DOI: 10.1038/s41586-021-03231-w. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33505023/>. Acesso em: 17 mar. 2021.

CHOUBEY, Divaker; WALTER, Scott; GENG, Yanbiao; XIN, Hong. Cytoplasmic localization of the interferon-inducible protein that is encoded by

the AIM2 (absent in melanoma) gene from the 200-gene family. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 474, n. 1, p. 38–42, 2000. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01571-4. Acesso em: 17 mar. 2021.

CHUNG, Yeonseok et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by IL-1 signaling. **Immunity**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 576, 2009. a. DOI: 10.1016/J.IMMUNI.2009.02.007. Disponível em: /pmc/articles/PMC2705871/. Acesso em: 2 dez. 2021.

CHUNG, Yeonseok et al. Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. **Immunity**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 576–587, 2009. b. DOI: 10.1016/J.IMMUNI.2009.02.007. Acesso em: 6 dez. 2021.

CHUNG, Yeonseok et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. **Immunity**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 576–587, 2009. c. DOI: 10.1016/J.IMMUNI.2009.02.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19362022/>. Acesso em: 6 dez. 2021

CIOFANI, Maria et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. **Cell**, [S. l.], v. 151, n. 2, p. 289–303, 2012. DOI: 10.1016/J.CELL.2012.09.016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23021777/>. Acesso em: 28 maio. 2022.

COLLINS, Bridget E.; GREER, Celeste B.; COLEMAN, Benjamin C.; SWEATT, J. David. Histone H3 lysine K4 methylation and its role in learning and memory 06 Biological Sciences 0604 Genetics 11 Medical and Health Sciences 1109 Neurosciences. **Epigenetics and Chromatin**, [S. l.], v. 12, n. 1, 2019. DOI: 10.1186/S13072-018-0251-8. Acesso em: 28 maio. 2022.

COSTA FRANCO, Miriam Maria Silva; MARIM, Fernanda Martins; ALVES-SILVA, Juliana; CERQUEIRA, Daiane; RUNGUE, M.; TAVARES, Isabela P.; OLIVEIRA, Sergio C. AIM2 senses Brucella abortus DNA in dendritic cells to induce IL-1 β secretion, pyroptosis and resistance to bacterial infection in mice. **Microbes and Infection**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 85–93, 2019. DOI: 10.1016/j.micinf.2018.09.001. Acesso em: 17 mar. 2021.

DAWSON, Michelle J.; TRAPANI, Joseph A. **HIN-200, a novel family of IFN-inducible nuclear proteins expressed in leukocytes** **Journal of Leukocyte Biology** Federation of American Societies for Experimental Biology, , 1996. DOI: 10.1002/jlb.60.3.310. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8830786/>. Acesso em: 17 mar. 2021.

DEYOUNG, Katherine L.; RAY, Michael E.; SU, Yan A.; ANZICK, Sarah L.; JOHNSTONE, Ricky W.; TRAPANI, Joseph A.; MELTZER, Paul S.; TRENT, Jeffrey M. Cloning a novel member of the human interferon-inducible gene family associated with control of tumorigenicity in a model of human melanoma. **Oncogene**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 453–457, 1997. DOI: 10.1038/sj.onc.1201206. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9242382/>. Acesso em: 17 mar. 2021.

DOMBROWSKI, Yvonne et al. Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. **Science translational**

medicine, [S. l.], v. 3, n. 82, 2011. DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.3002001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21562230/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

EICHHOLZ, Karsten et al. Immune-Complexed Adenovirus Induce AIM2-Mediated Pyroptosis in Human Dendritic Cells. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 12, n. 9, 2016. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005871. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27636895/>. Acesso em: 17 mar. 2021.

EL-ZAATARI, Mohamad et al. Aim2-mediated/IFN- β -independent regulation of gastric metaplastic lesions via CD8+ T cells. **JCI Insight**, [S. l.], v. 5, n. 5, 2020. DOI: 10.1172/jci.insight.94035. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.94035>. Acesso em: 17 mar. 2021.

FANG, Rendong et al. Critical roles of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 187, n. 9, p. 4890–4899, 2011. DOI: 10.4049/JIMMUNOL.1100381. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21957143/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

FENG, Siwei et al. Absent in melanoma 2 inflammasome is required for host defence against *Streptococcus pneumoniae* infection. **Innate immunity**, [S. l.], v. 25, n. 7, p. 412–419, 2019. DOI: 10.1177/1753425919860252. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31266383/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

FERNANDES-ALNEMRI, Teresa; YU, Je Wook; DATTA, Pinaki; WU, Jianghong; ALNEMRI, Emad S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. **Nature**, [S. l.], v. 458, n. 7237, p. 509–513, 2009. DOI: 10.1038/nature07710. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19158676/>. Acesso em: 17 mar. 2021.

FISCH, Daniel; BANDO, Hironori; CLOUGH, Barbara; HORNING, Veit; YAMAMOTO, Masahiro; SHENOY, Avinash R.; FRICKEL, Eva-Maria. Human GBP1 is a microbe-specific gatekeeper of macrophage apoptosis and pyroptosis. **The EMBO Journal**, [S. l.], v. 38, n. 13, 2019. DOI: 10.15252/EMBJ.2018100926. Disponível em: <https://pmc/articles/PMC6600649/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

FUJINO, S.; ANDOH, A.; BAMBA, S.; OGAWA, A.; HATA, K.; ARAKI, Y.; BAMBA, T.; FUJIYAMA, Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. **Gut**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 65–70, 2003. DOI: 10.1136/GUT.52.1.65. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12477762/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

GABORIAU-ROUTHIAU, Valérie et al. The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. **Immunity**, [S. l.], v. 31, n. 4, p. 677–689, 2009. DOI: 10.1016/J.IMMUNI.2009.08.020. Acesso em: 2 dez. 2021.

GAO, Yajing et al. Transcriptional profiling identifies caspase-1 as a T cell-intrinsic regulator of Th17 differentiation. **The Journal of experimental**

medicine, [S. l.], v. 217, n. 4, 2020. DOI: 10.1084/JEM.20190476. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31967646/>. Acesso em: 6 dez. 2021.

GE, Jianning; GONG, Yi Nan; XU, Ying; SHAO, Feng. Preventing bacterial DNA release and absent in melanoma 2 inflammasome activation by a Legionella effector functioning in membrane trafficking. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 109, n. 16, p. 6193–6198, 2012. DOI: 10.1073/PNAS.1117490109/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201117490SI.PDF. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22474394/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

GOTO, Y. Segmented filamentous bacteria antigens presented by intestinal dendritic cells drive mucosal Th17 cell differentiation. **Immunity**, [S. l.], v. 40, p. 594–607, 2014. . Acesso em: 24 fev. 2021.

GUPTA, Gaurav et al. Inflammasome gene expression is associated with immunopathology in human localized cutaneous leishmaniasis. **Cellular Immunology**, [S. l.], v. 341, p. 103920, 2019. DOI: 10.1016/J.CELLIMM.2019.04.008. Acesso em: 2 dez. 2021.

HANAMSAGAR, Richa; ALDRICH, Amy; KIELIAN, Tammy. Critical role for the AIM2 inflammasome during acute CNS bacterial infection. **Journal of neurochemistry**, [S. l.], v. 129, n. 4, p. 704–711, 2014. DOI: 10.1111/JNC.12669. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24484406/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

HARBOUR, Stacey N.; MAYNARD, Craig L.; ZINDL, Carlene L.; SCHOEB, Trenton R.; WEAVER, Casey T. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 112, n. 22, p. 7061–7066, 2015. DOI: 10.1073/PNAS.1415675112. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26038559/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

HIROTA, Keiji et al. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. **Nature Immunology** 2011 12:3, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 255–263, 2011. DOI: 10.1038/ni.1993. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni.1993>. Acesso em: 2 dez. 2021.

HORNUNG, Veit; ABLASSER, Andrea; CHARREL-DENNIS, Marie; BAUERNFEIND, Franz; HORVATH, Gabor; CAFFREY, Daniel R.; LATZ, Eicke; FITZGERALD, Katherine A. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. **Nature**, [S. l.], v. 458, n. 7237, p. 514–518, 2009. DOI: 10.1038/nature07725. Disponível em: </pmc/articles/PMC2726264/>. Acesso em: 17 mar. 2021.

HOU, Guoqing; BISHU, Shrinivas. Th17 Cells in Inflammatory Bowel Disease: An Update for the Clinician. In: INFLAMMATORY BOWEL DISEASES 2020, **Anais** [...]. : Oxford University Press, 2020. p. 653–661. DOI: 10.1093/ibd/izz316. Disponível em: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/26/5/653/5714220>. Acesso em: 24 fev. 2021.

HU, Shuiqing; PENG, Lan; KWAK, Youn Tae; TEKIPPE, Erin Mc Elvania; PASARE, Chandrashekhar; MALTER, James S.; HOOPER, Lora V.; ZAKI, Md Hasan. The DNA Sensor AIM2 Maintains Intestinal Homeostasis via Regulation of Epithelial Antimicrobial Host Defense. **Cell Reports**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 1922–1936, 2015. DOI: 10.1016/J.CELREP.2015.10.040. Acesso em: 2 dez. 2021.

HYUN, Ho Park; LO, Yu Chih; LIN, Su Chang; WANG, Liwei; JIN, Kuk Yang; WU, Hao. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. **Annual review of immunology**, [S. l.], v. 25, p. 561–586, 2007. DOI: 10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.25.022106.141656. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17201679/>. Acesso em: 28 nov. 2021.

ICHIYAMA, Kenji et al. Foxp3 inhibits ROR γ mat-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with ROR γ mat. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 283, n. 25, p. 17003–17008, 2008. a. DOI: 10.1074/JBC.M801286200. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18434325/>. Acesso em: 6 dez. 2021.

ICHIYAMA, Kenji et al. Foxp3 inhibits ROR γ mat-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with ROR γ mat. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 283, n. 25, p. 17003–17008, 2008. b. DOI: 10.1074/JBC.M801286200. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18434325/>. Acesso em: 6 dez. 2021.

IMANISHI, Takayuki et al. Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation. **Nature Communications** 2014 5:1, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–12, 2014. DOI: 10.1038/ncomms4566. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms4566>. Acesso em: 6 dez. 2021.

ITO, Reiko et al. Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. **Biochemical and biophysical research communications**, [S. l.], v. 377, n. 1, p. 12–16, 2008. DOI: 10.1016/J.BBRC.2008.09.019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18796297/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

IVANOV, Ivaylo I.; MCKENZIE, Brent S.; ZHOU, Liang; TADOKORO, Carlos E.; LEPELLEY, Alice; LAFAILLE, Juan J.; CUA, Daniel J.; LITTMAN, Dan R. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. **Cell**, [S. l.], v. 126, n. 6, p. 1121–1133, 2006. a. DOI: 10.1016/J.CELL.2006.07.035/ATTACHMENT/E99CA17A-A18F-45D4-8550-15B80B8ABCF7/MMC1.PDF. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0092867406011056/fulltext>. Acesso em: 2 dez. 2021.

IVANOV, Ivaylo I.; MCKENZIE, Brent S.; ZHOU, Liang; TADOKORO, Carlos E.; LEPELLEY, Alice; LAFAILLE, Juan J.; CUA, Daniel J.; LITTMAN, Dan R. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. **Cell**, [S. l.], v. 126, n. 6, p. 1121–1133, 2006. b. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.035. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16990136/>. Acesso em: 14 abr. 2021.

IVANOV, Ivaylo I.; ZHOU, Liang; LITTMAN, Dan R. Transcriptional Regulation of Th17 Cell Differentiation. **Seminars in immunology**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 409, 2007. DOI: 10.1016/J.SMIM.2007.10.011. Disponível em: /pmc/articles/PMC2696342/. Acesso em: 2 dez. 2021.

JAKOBS, Christopher; PERNER, Sven; HORNUNG, Veit. AIM2 Drives Joint Inflammation in a Self-DNA Triggered Model of Chronic Polyarthritis. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. e0131702, 2015. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0131702. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0131702>. Acesso em: 2 dez. 2021.

JIN, Tengchuan et al. Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. **Immunity**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 561–571, 2012. DOI: 10.1016/J.IMMUNI.2012.02.014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22483801/>. Acesso em: 28 nov. 2021.

KARKI, Rajendra; MAN, Si Ming; MALIREDDI, R. K. Subbarao; GURUNG, Prajwal; VOGEL, Peter; LAMKANFI, Mohamed; KANNEGANTI, Thirumala Devi. Concerted activation of the AIM2 and NLRP3 inflammasomes orchestrates host protection against Aspergillus infection. **Cell host & microbe**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 357–368, 2015. DOI: 10.1016/J.CHOM.2015.01.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25704009/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

KOMORI, H. Kiyomi; HART, Traver; LAMERE, Sarah A.; CHEW, Pamela V.; SALOMON, Daniel R. Defining CD4 T Cell Memory by the Epigenetic Landscape of CpG DNA Methylation. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 194, n. 4, p. 1565–1579, 2015. DOI: 10.4049/jimmunol.1401162. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25576597/>. Acesso em: 17 mar. 2021.

KUMARI, Puja; RUSSO, Ashley J.; SHIVCHARAN, Sonia; RATHINAM, Vijay A. AIM2 in health and disease: Inflammasome and beyond. **Immunological reviews**, [S. l.], v. 297, n. 1, p. 83–95, 2020. DOI: 10.1111/IMR.12903. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32713036/>. Acesso em: 28 nov. 2021.

LANGRISH, Claire L.; CHEN, Yi; BLUMENSCHNEIN, Wendy M.; MATTSO, Jeanine; BASHAM, Beth; SEDGWICK, Jonathan D.; MCCLANAHAN, Terrill; KASTELEIN, Robert A.; CUA, Daniel J. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 201, n. 2, p. 233–240, 2005. DOI: 10.1084/JEM.20041257. Disponível em: **Erro! A referência de hiperlink não é válida.** Acesso em: 2 dez. 2021.

LEITE, Jefferson Antônio et al. The DNA Sensor AIM2 Protects against Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes by Regulating Intestinal Homeostasis via the IL-18 Pathway. **Cells**, [S. l.], v. 9, n. 4, 2020. DOI: 10.3390/cells9040959. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32295112/>. Acesso em: 22 mar. 2021.

LEPPKES, Moritz et al. ROR γ -Expressing Th17 Cells Induce Murine Chronic Intestinal Inflammation via Redundant Effects of IL-17A and IL-17F. *[S. l.]*, 2009. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.10.018. Acesso em: 17 mar. 2021.

LU, Alvin; LI, Yang; YIN, Qian; RUAN, Jianbin; YU, Xiong; EGELMAN, Edward; WU, Hao. Plasticity in PYD assembly revealed by cryo-EM structure of the PYD filament of AIM2. **Cell Discovery** **2015** **1:1**, *[S. l.]*, v. 1, n. 1, p. 1–14, 2015. DOI: 10.1038/celldisc.2015.13. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/celldisc201513>. Acesso em: 28 nov. 2021.

MANGAN, Paul R. et al. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. **Nature** **2006** **441:7090**, *[S. l.]*, v. 441, n. 7090, p. 231–234, 2006. DOI: 10.1038/nature04754. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature04754>. Acesso em: 2 dez. 2021.

MARTIN, Bradley N. et al. T cell–intrinsic ASC critically promotes TH17-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. **Nature Immunology** **2016** **17:5**, *[S. l.]*, v. 17, n. 5, p. 583–592, 2016. DOI: 10.1038/ni.3389. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni.3389>. Acesso em: 6 dez. 2021.

MATYSZEWSKI, Mariusz; MORRONE, Seamus R.; SOHN, Jungsan. Digital signaling network drives the assembly of the AIM2-ASC inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, *[S. l.]*, v. 115, n. 9, p. E1963–E1972, 2018. DOI: 10.1073/PNAS.1712860115. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29440442/>. Acesso em: 28 nov. 2021.

MORRISON, P. J.; BENDING, D.; FOUSER, L. A.; WRIGHT, J. F.; STOCKINGER, B.; COOKE, A.; KULLBERG, M. C. Th17-cell plasticity in Helicobacter hepaticus–induced intestinal inflammation. **Mucosal Immunology** **2013** **6:6**, *[S. l.]*, v. 6, n. 6, p. 1143–1156, 2013. DOI: 10.1038/mi.2013.11. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/mi201311>. Acesso em: 2 dez. 2021.

NISHIHARA, Mika et al. IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. **International immunology**, *[S. l.]*, v. 19, n. 6, p. 695–702, 2007. DOI: 10.1093/INTIMM/DXM045. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17493959/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

NLRP3 and AIM2 inflammasome-triggered Th17 cell response promotes severe immunopathology in schistosomiasis | The Journal of Immunology. *[s.d.]*. Disponível em: https://www.jimmunol.org/content/206/1_Supplement/112.07. Acesso em: 6 dez. 2021.

PARK, Su Ho; HAM, Sunyoung; LEE, Arim; MÖLLER, Andreas; KIM, Tae Sung. NLRP3 negatively regulates Treg differentiation through Kpna2-mediated nuclear translocation. **The Journal of biological chemistry**, *[S. l.]*, v. 294, n. 47, p. 17951–17961, 2019. DOI: 10.1074/JBC.RA119.010545. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31597697/>. Acesso em: 6 dez. 2021.

RATHINAM, Vijay A. K. et al. The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. **Nature immunology**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 395–402, 2010. DOI: 10.1038/NI.1864. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20351692/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

RATSIMANDRESY, Rojo A.; INDRAMOHAN, Mohanalaxmi; DORFLEUTNER, Andrea; STEHLIK, Christian. The AIM2 inflammasome is a central regulator of intestinal homeostasis through the IL-18/IL-22/STAT3 pathway. **Cellular and Molecular Immunology**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 127–142, 2017. DOI: 10.1038/cmi.2016.35. Disponível em: </pmc/articles/PMC5214942/>. Acesso em: 22 mar. 2021.

REINHOLZ, M.; KAWAKAMI, Y.; SALZER, S.; KREUTER, A.; DOMBROWSKI, Y.; KOGLIN, S.; KRESSE, S.; RUZICKA, T.; SCHAUBER, J. HPV16 activates the AIM2 inflammasome in keratinocytes. **Archives of dermatological research**, [S. l.], v. 305, n. 8, p. 723–732, 2013. DOI: 10.1007/S00403-013-1375-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23764897/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

ROBERTS, Tara L. et al. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. **Science**, [S. l.], v. 323, n. 5917, p. 1057–1060, 2009. DOI: 10.1126/science.1169841. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19131592/>. Acesso em: 17 mar. 2021.

SAIGA, Hiroyuki; KITADA, Shoko; SHIMADA, Yosuke; KAMIYAMA, Naganori; OKUYAMA, Megumi; MAKINO, Masahiko; YAMAMOTO, Masahiro; TAKEDA, Kiyoshi. Critical role of AIM2 in Mycobacterium tuberculosis infection. **International immunology**, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 637–644, 2012. DOI: 10.1093/INTIMM/DXS062. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22695634/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

SCHNUPF, Pamela; GABORIAU-ROUTHIAU, Valérie; CERF-BENSUSSAN, Nadine. Host interactions with Segmented Filamentous Bacteria: An unusual trade-off that drives the post-natal maturation of the gut immune system. **Seminars in Immunology**, [S. l.], v. 25, n. 5, p. 342–351, 2013. DOI: 10.1016/J.SMIM.2013.09.001. Acesso em: 2 dez. 2021.

SCHNUPF, Pamela; GABORIAU-ROUTHIAU, Valérie; SANSONETTI, Philippe J.; CERF-BENSUSSAN, Nadine. Segmented filamentous bacteria, Th17 inducers and helpers in a hostile world. **Current Opinion in Microbiology**, [S. l.], v. 35, p. 100–109, 2017. DOI: 10.1016/J.MIB.2017.03.004. Acesso em: 2 dez. 2021.

STOCKINGER, Brigitta; OMENETTI, Sara. **The dichotomous nature of T helper 17 cells** *Nature Reviews Immunology* Nature Publishing Group, , 2017. DOI: 10.1038/nri.2017.50. Disponível em: **Erro! A referência de hiperlink não é válida.** Acesso em: 24 fev. 2021.

SVENSSON, Alexandra; PATZI CHURQUI, Marianela; SCHLÜTER, Kerstin; LIND, Liza; ERIKSSON, Kristina. Maturation-dependent expression of AIM2 in human B-cells. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 8, p. e0183268, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0183268. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0183268>. Acesso em: 17 mar. 2021.

SVENSSON, Mattias N. D. et al. Reduced expression of phosphatase PTPN2 promotes pathogenic conversion of Tregs in autoimmunity. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 129, n. 3, p. 1193–1210, 2019. DOI: 10.1172/JCI123267. Acesso em: 28 maio. 2022.

THEOBALD, Douglas L.; MITTON-FRY, Rachel M.; WUTTKE, Deborah S. Nucleic acid recognition by OB-fold proteins. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, [S. l.], v. 32, p. 115–133, 2003. DOI: 10.1146/ANNUREV.BIOPHYS.32.110601.142506. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12598368/>. Acesso em: 28 nov. 2021.

TRENT, Jeffrey M.; STANBRIDGE, Eric J.; MCBRIDE, Heyoung L.; MEESE, Eckart U.; CASEY, Graham; ARAUJO, Dnia E.; WITKOWSKI, Colette M.; NAGLE, Raymond B. Tumorigenicity in human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. **Science**, [S. l.], v. 247, n. 4942, p. 568–571, 1990. DOI: 10.1126/science.2300817. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/>. Acesso em: 17 mar. 2021.

TSOMPANA, Maria; BUCK, Michael J. Chromatin accessibility: A window into the genome. **Epigenetics and Chromatin**, [S. l.], v. 7, n. 1, 2014. DOI: 10.1186/1756-8935-7-33. Acesso em: 28 maio. 2022.

VELDHOEN, Marc; HIROTA, Keiji; CHRISTENSEN, Jillian; O’GARRA, Anne; STOCKINGER, Brigitta. Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 206, n. 1, p. 43–49, 2009. DOI: 10.1084/JEM.20081438. Acesso em: 3 dez. 2021.

VELDHOEN, Marc; HOCKING, Richard J.; ATKINS, Christopher J.; LOCKSLEY, Richard M.; STOCKINGER, Brigitta. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 179–189, 2006. DOI: 10.1016/J.IMMUNI.2006.01.001/ATTACHMENT/C408AB1B-0BD6-4B45-A197-B75282853BC9/MMC1.PDF. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S1074761306000045/fulltext>. Acesso em: 2 dez. 2021.

WANG, Bing; TIAN, Yuan; YIN, Qian. AIM2 Inflammasome Assembly and Signaling. **Advances in experimental medicine and biology**, [S. l.], v. 1172, p. 143–155, 2019. DOI: 10.1007/978-981-13-9367-9_7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31628655/>. Acesso em: 28 nov. 2021.

WANG, Bing; YIN, Qian. AIM2 inflammasome activation and regulation: A structural perspective. **Journal of structural biology**, [S. l.], v. 200, n. 3, p. 279–282, 2017. DOI: 10.1016/J.JSB.2017.08.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28813641/>. Acesso em: 28 nov. 2021.

WEI, Lai; LAURENCE, Arian; ELIAS, Kevin M.; O'SHEA, John J. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 282, n. 48, p. 34605–34610, 2007. DOI: 10.1074/JBC.M705100200. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17884812/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

WU, Haijing et al. The IL-21-TET2-AIM2-c-MAF pathway drives the T follicular helper cell response in lupus-like disease. **Clinical and Translational Medicine**, [S. l.], v. 12, n. 3, 2022. DOI: 10.1002/CTM2.781. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35343082/> Acesso em: 28 maio. 2022.

YANG, Ming et al. AIM2 deficiency in B cells ameliorates systemic lupus erythematosus by regulating Blimp-1–Bcl-6 axis-mediated B-cell differentiation. **Signal Transduction and Targeted Therapy** 2021 6:1, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–11, 2021. DOI: 10.1038/s41392-021-00725-x. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00725-x>. Acesso em: 2 dez. 2021.

YANG, Xuexian O. et al. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. **The Journal of experimental medicine**, [S. l.], v. 205, n. 5, p. 1063–1075, 2008. DOI: 10.1084/JEM.20071978. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18411338/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

YANG, Yang et al. the AIM2 inflammasome is involved in macrophage activation during infection with virulent Mycobacterium bovis strain. **The Journal of infectious diseases**, [S. l.], v. 208, n. 11, p. 1849–1858, 2013. DOI: 10.1093/INFDIS/JIT347. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23901081/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

YEH, Wen I.; MCWILLIAMS, Ian L.; HARRINGTON, Laurie E. IFN γ inhibits Th17 differentiation and function via Tbet-dependent and Tbet-independent mechanisms. **Journal of neuroimmunology**, [S. l.], v. 267, n. 0, p. 20, 2014. DOI: 10.1016/J.JNEUROIM.2013.12.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24933997/>. Acesso em: 6 dez. 2021.

YU, Xiao et al. Inflammasome activation negatively regulates MyD88-IRF7 type I IFN signaling and anti-malaria immunity. **Nature communications**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2018. DOI: 10.1038/S41467-018-07384-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30470758/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

ZHANG, Weijuan; CAI, Yanxing; XU, Wei; YIN, Zhinan; GAO, Xiaoming; XIONG, Sidong. AIM2 facilitates the apoptotic DNA-induced systemic lupus erythematosus via arbitrating macrophage functional maturation. **Journal of Clinical Immunology**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 925–937, 2013. DOI: 10.1007/S10875-013-9881-6. Acesso em: 2 dez. 2021.

ZHANG, Zili; ZHENG, Mingquan; BINDAS, Julie; SCHWARZENBERGER, Paul; KOLLS, Jay K. Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. **Inflammatory bowel diseases**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 382–388, 2006. DOI: 10.1097/01.MIB.0000218764.06959.91. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16670527/>. Acesso em: 2 dez. 2021.

ZHOU, Liang et al. TGF- β -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. **Nature**, [S. l.], v. 453, n. 7192, p. 236–240, 2008. DOI: 10.1038/nature06878. Acesso em: 6 dez. 2021.